

# **Optimierung flüssiger Poloxamer 407-haltiger Formulierungen zur simultanen Behandlung von Haut- und Nagelpilz**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Tobias Kracht  
aus Göttingen

1. Referentin: Professorin Dr. Christel Müller-Goymann  
2. Referentin: Professorin Dr. Heike Bunjes  
eingereicht am: 23.03.2020  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 23.10.2020

Druckjahr 2021

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

Kracht, T. & Müller-Goymann, C. C.: Antifungal efficacy of liquid poloxamer 407-based emulsions loaded with sertaconazole nitrate. International Journal of Pharmaceutics 585: 119400 (2020).

### **Tagungsbeiträge**

Kracht, T. & Müller-Goymann, C. C.: Evaluation of the antifungal efficacy of sertaconazole nitrate containing formulations against *Trichophyton rubrum* in an infected nail plate model and comparison to ciclopirox-olamine containing formulations. (Poster) International Conference on Toxicology and Clinical Pharmacology, Rom (2017).

Kracht, T. & Müller-Goymann, C. C.: Stability studies and rheological behavior of liquid poloxamer 407-based formulations containing sertaconazole nitrate. (Poster) 23. GD-Jahrestagung, Düsseldorf (2019).

Kracht, T. & Müller-Goymann, C. C.: In vitro permeation and penetration of sertaconazole nitrate from poloxamer 407-based formulations through human stratum corneum and keratin films. (Poster, akzeptiert) 24. GD-Jahrestagung, Hannover (2020).

### **Patentanmeldung**

Kracht, T.<sup>1</sup>, Müller-Goymann, C.C.<sup>1</sup>, Schwantes, U.<sup>2</sup>, Neumeister, C.<sup>2</sup>, Götz, M. R.<sup>2</sup>: Novel sertaconazole compositions. Europäische Patentanmeldung EP20156098.4 (2020). <sup>1</sup>Technische Universität Braunschweig; <sup>2</sup> Dr. Pfleger Arzneimittel GmbH



Diese Arbeit wurde angefertigt unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. Christel C. Müller-Goymann am Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

Frau Prof. Dr. Christel C. Müller-Goymann

danke ich herzlich für das interessante Thema sowie für die freundliche, persönliche Betreuung und die vielen hilfreichen Diskussionen.

Frau Prof. Dr. Heike Bunjes danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Den Institutsmitgliedern des Instituts für Pharmazeutische Technologie danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und für viele hilfreiche Gespräche. Bei Lucia Albrecht, Carmen Gröchte-meier, Manuela Handt und Kirsten Nebelung möchte ich mich für die Unterstützung an diversen Geräten bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. F. M. Hasse für die Bereitstellung von Hautspenden und der Firma Dolorgiet GmbH & Co. KG für die Bereitstellung von Poloxamer 407. Der Firma Dr. Pfleger Arzneimittel GmbH danke ich für die finanzielle Unterstützung dieses Promotionsprojekts sowie für die Bereitstellung von Sertaconazolnitrat. Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Neumeister und Herrn Dr. Schwantes für die stets freundliche und konstruktive Kommunikation.

Besonders herzlich danke ich meiner Familie für die Unterstützung während der gesamten Zeit, insbesondere meiner Frau Arieska dafür, dass sie immer für mich da ist.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Allgemeiner Teil.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Menschliche Haut.....</b>	<b>4</b>
2.1.1 Anatomie.....	4
2.1.2 Stratum corneum (SC) .....	5
2.1.3 Permeation durch das SC.....	7
2.1.4 Verbesserung der Permeation durch das SC .....	7
<b>2.2 Menschliche Nägel.....</b>	<b>9</b>
2.2.1 Keratin .....	9
2.2.2 Anatomie.....	10
2.2.3 Permeation durch menschliche Nägel .....	12
2.2.4 Verbesserung der Permeation durch menschliche Nägel .....	13
2.2.5 Nagelmodelle.....	15
<b>2.3 Pilzinfektionen des Nagels und der Haut.....</b>	<b>17</b>
2.3.1 Onychomykose .....	17
2.3.2 Behandlung der Onychomykose .....	19
2.3.3 Tinea pedis .....	21
2.3.4 Behandlung der Tinea pedis .....	22
2.3.5 Gleichzeitige Infektion mit Tinea pedis und Onychomykose .....	23
<b>2.4 Entwicklung antimykotischer Poloxamer 407-basierter Formulierungen.....</b>	<b>23</b>
2.4.1 Poloxamer 407 (P407).....	23
2.4.2 Thermogelieverhalten .....	24
2.4.3 P407-basierte Formulierungen .....	25
2.4.4 Sertaconazol (SRT) .....	26
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Material .....</b>	<b>28</b>

<b>3.2 Methoden .....</b>	<b>29</b>
3.2.1 Zusammensetzung und Nomenklatur der Formulierungen .....	29
3.2.2 Herstellung der Formulierungen.....	31
3.2.3 Bestimmung der Sättigungslöslichkeit von SRT in Komponenten und Formulierungen.....	31
3.2.4 Stabilitätsuntersuchungen wirkstofffreier Formulierungen .....	32
3.2.4.1 Makroskopische Charakterisierung .....	32
3.2.4.2 Mikroskopische Charakterisierung.....	33
3.2.5 Stabilitätsuntersuchungen wirkstoffhaltiger Formulierungen .....	34
3.2.5.1 Auswahl der Formulierungen.....	34
3.2.5.2 Chemische Stabilität von SRT .....	35
3.2.6 HPLC-Analytik.....	35
3.2.7 Gewinnung von SC.....	36
3.2.8 Herstellung von Keratinfilmen (KF) .....	36
3.2.9 Herstellung von bovinen Hufscheiben (BH) .....	37
3.2.10 Permeationsuntersuchungen .....	38
3.2.10.1 Versuchsaufbau.....	38
3.2.10.2 Permeationsuntersuchungen durch SC.....	41
3.2.10.3 Permeationsuntersuchungen durch Nagelmodelle .....	42
3.2.10.4 Extraktion des Wirkstoffs aus SC und Nagelmodellen nach Ende der Permeationsuntersuchung.....	43
3.2.11 Extraktion von Nagelmodellen und menschlichen Nagelschnipseln (NS) nach Inkubation mit SRT.....	43
3.2.12 Infiziertes Nagelmodell.....	44
3.2.13 Infiziertes SC-Modell.....	45
3.2.14 Rheologische Untersuchungen.....	45
3.2.14.1 Fließkurven.....	46
3.2.14.2 Oszillationsrheologische Untersuchungen.....	46



3.2.15 DSC-Untersuchungen.....	47
3.2.15.1 DSC-Untersuchungen an SC.....	47
3.2.15.2 DSC-Untersuchungen an Nagelmodellen und NS.....	48
3.2.16 Statistische Auswertung der Daten .....	49
<b>4 Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>50</b>
<b>4.1 Charakterisierung Poloxamer 407-basierter Formulierungen.....</b>	<b>50</b>
4.1.1 Zusammensetzung und makroskopische Charakterisierung .....	50
4.1.2 Bestimmung der Sättigungslöslichkeit .....	52
4.1.3 Stabilitätsuntersuchungen wirkstofffreier Formulierungen .....	55
4.1.3.1 Änderungen der makroskopischen Eigenschaften wirkstofffreier Formulierungen .....	56
4.1.3.2 Änderungen der mikroskopischen Eigenschaften wirkstofffreier Formulierungen .....	59
4.1.4 Stabilitätsuntersuchungen wirkstoffhaltiger Formulierungen.....	62
4.1.4.1 Änderungen der makroskopischen Eigenschaften wirkstoffhaltiger Formulierungen .....	63
4.1.4.2 Änderungen der mikroskopischen Eigenschaften wirkstoffhaltiger Formulierungen .....	64
4.1.5 Chemische Stabilität von SRT in den Formulierungen.....	66
<b>4.2 Permeationsuntersuchungen durch humanes Stratum corneum und     durch Keratinfilm .....</b>	<b>67</b>
4.2.1 Löslichkeit von SRT im Akzeptormedium und Einhaltung von sink- Bedingungen.....	67
4.2.2 Permeationsuntersuchungen durch SC .....	70
4.2.2.1 Erste Permeationsserie .....	70
4.2.2.2 Versuche zur Variabilität des SC .....	71
4.2.2.3 Zweite Permeationsserie .....	72
4.2.3 Permeationsuntersuchungen durch KF.....	77

<b>4.3 Wirkstoffmenge in Stratum corneum, Keratinfilmern und Nagelschnipseln</b>	<b>83</b>
4.3.1 Extraktion von SRT aus SC nach Beendigung der Permeations- untersuchung	83
4.3.2 Extraktion von SRT aus KF nach Beendigung der Permeations- untersuchung	86
4.3.3 Extraktion von Nagelmodellen und NS nach Inkubation mit SRT-haltigen Formulierungen	87
<b>4.4 Hemmung des Pilzwachstums von <i>T. rubrum</i> in in vitro- Infektionsmodellen</b>	<b>89</b>
4.4.1 Infiziertes Nagelmodell	89
4.4.2 Infiziertes SC-Modell	92
<b>4.5 Rheologische Charakterisierung der Formulierungen</b>	<b>94</b>
4.5.1 Fließverhalten und dynamische Viskosität	94
4.5.2 Bestimmung möglicher Thermogelierungspunkte	99
<b>4.6 Dynamische Differenzkalorimetrie</b>	<b>102</b>
4.6.1 Verschiebung endothermer Signale in SC	102
4.6.2 Denaturierungstemperatur von Keratin in BH, KF und NS	104
<b>5 Abschlussdiskussion</b>	<b>110</b>
<b>5.1 Physikochemische Eigenschaften und Stabilität Poloxamer 407-basierter         Formulierungen</b>	<b>110</b>
<b>5.2 Permeationsuntersuchungen durch humanes Stratum corneum und         Keratinfilme</b>	<b>112</b>
<b>5.3 Evaluation der Wachstumshemmung von <i>T. rubrum</i> in Infektionsmodellen</b>	<b>115</b>
<b>5.4 Rheologische Eigenschaften</b>	<b>118</b>
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>121</b>
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	<b>123</b>

## Abkürzungsverzeichnis

5-ALA	5-Aminolävulinsäure
BH	Bovine Hufscheiben
CPX	Ciclopiroxolamin
DMIS	Dimethylisosorbid
DMSO	Dimethylsulfoxid
IPA	Isopropanol
KF	Keratinfilme
LVEB	Linear viskoelastischer Bereich
MKT	Mittelkettige Triglyceride = Miglyol® 812
NS	menschliche Nagelschnipsel
PBS	Phosphate buffered saline (isotonisch, pH 7,4)
PG	Propylenglykol
P407	Poloxamer 407
TBF	Terbinafinhydrochlorid
TEER-Wert	Transepithelialer elektrischer Widerstand (transepithelial electrical resistance)
TGP	Thermogelierungspunkt
SC	Stratum corneum
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SRT	Sertaconazolnitrat

# 1 Einleitung

Tinea pedis und Onychomykose zählen zu den häufigsten Infektionen weltweit. Die Prävalenz der Onychomykose wird weltweit auf 5,5% geschätzt (Gupta et al., 2017), bei der Tinea pedis wird von einer Lebenszeit-Prävalenz von 70% ausgegangen (Rippon, 1988). Durch das ähnliche Erregerspektrum treten sie häufig auch gleichzeitig auf (Ogasawara et al., 2003; Szepletowski et al., 2006). Die Behandlung kann systemisch oder lokal erfolgen, die Heilungsraten sind jedoch in beiden Fällen relativ gering und nach erfolgter Therapie kann es zu Rezidiven kommen. Die systemische Therapie erzielt bessere Heilungsraten als die lokale (Gupta et al., 2004), bringt jedoch ein höheres Risiko für unerwünschte Arzneimittelwirkungen mit sich (The Medical Letter, 2009), weshalb sie bei Patienten mit Begleiterkrankungen häufig nicht anzuraten ist. Die lokale Therapie hat ein günstiges Nebenwirkungsspektrum, allerdings sind die Heilungsraten geringer als in der systemischen Therapie.

Durch die niedrige Permeabilität des Stratum corneum (SC) und der Nagelplatte für die meisten Wirkstoffe ist es eine Herausforderung, eine ausreichende Wirkstoffmenge im infizierten Gewebe zu erreichen. Bei einer Nagelpilzinfektion muss der Wirkstoff durch die Nagelplatte bis in das Nagelbett permeieren (Westerberg und Voyack, 2013), das in der Regel ebenfalls infiziert ist. Ein weiteres Problem ist die Adhärenz der Patienten, da sehr lange Behandlungszeiten notwendig sind und die Therapie auch über die klinische Heilung hinaus fortgesetzt werden muss, um eine Reinfektion durch Pilzsporen zu vermeiden (Gupta et al., 2017). Durch eine gleichzeitige Infektion von Haut und Nagel kann es außerdem zu einer gegenseitigen Ansteckung kommen, wenn nicht beide adäquat behandelt werden. Hierfür sind in der topischen Therapie bislang zwei Behandlungen notwendig (beispielsweise mit antimykotischem Nagellack und einer Creme), was die Adhärenz der Patienten verschlechtert. Aus diesen Gründen ist es wünschenswert, neue Therapieoptionen zu entwickeln, die einerseits bessere Heilungsraten durch eine effiziente Bekämpfung der Erreger erzielen und andererseits die Adhärenz der Patienten fördern. Für den Wirkstofftransport durch die Nagelplatte werden mechanische Verfahren getestet, beispielsweise die Abrasion des Nagels oder eine Auflösung durch die keratolytische Wirkung von Harnstoff. Andere Ansätze beschäftigten sich mit Stoffen, die die Permeabilität von Nagelplatte und SC erhöhen können. Ein solcher Ansatz wird in dieser Arbeit mit Poloxamer 407 (P407)-basierten Formulierungen verfolgt. Halbfeste P407-basierte Formulierungen mit den Wirkstoffen

Terbinafinhydrochlorid (TBF) und Ciclopiroxolamin (CPX) zeigten vielversprechende Permeationseigenschaften durch SC im Vergleich zu Marktprodukten (Täuber und Müller-Goymann, 2015b), was sie zu einer interessanten Option zur Behandlung der Tinea pedis macht. Außerdem zeigte sich in einem infizierten Nagelmodell, dass das Pilzwachstum von *Trichophyton rubrum*, dem häufigsten Erreger von Tinea pedis und Onychomykose, vollständig gehemmt werden konnte. Somit stellt sich die Frage, ob sich P407-basierte Formulierungen für eine simultane Behandlung der Tinea pedis und der Onychomykose eignen.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, eine P407-basierte Formulierung zu entwickeln, die gute Permeationseigenschaften sowohl durch den menschlichen Nagel als auch durch das SC aufweist, um eine simultane Behandlung der Tinea pedis und der Onychomykose zu ermöglichen. Da Formulierungen mit geringer komplexer Viskosität eine erhöhte Permeation der Wirkstoffe zeigten und in einem infizierten Nagelmodell eine vollständige Hemmung des Pilzwachstums erzielten, soll dabei der Fokus auf flüssigen Varianten der P407-basierten Formulierungen liegen. Vorteil der simultanen Behandlung wäre es, dass nur noch ein Arzneimittel appliziert werden müsste, wodurch die Adhärenz verbessert wird. Flüssige Formulierungen können aufgesprüht werden, was eine einfache Applikation auf Haut und Nägeln gleichzeitig ermöglicht. Dabei kann der Wirkstoff nicht nur transungual, sondern auch subungual in die Nagelmatrix abgegeben werden. Dies kann die Wirkstoffkonzentration in der Nagelmatrix deutlich erhöhen, da die Nagelplatte auf diesem Weg nicht überwunden werden muss (Gupta und Simpson, 2016). Ein weiterer Vorteil flüssiger Formulierungen im Vergleich zu Lacken ist, dass sie nicht regelmäßig entfernt werden müssen, was die Adhärenz zusätzlich verbessert (Gupta und Simpson, 2016). Durch Verdunstung flüchtiger Bestandteile bildet sich ein halbfester Film, der am Applikationsort verbleibt und eine Abgabe des Wirkstoffs über die Zeit erzielt.

Als Wirkstoff wurde Sertaconazolnitrat (SRT) gewählt. Hierbei handelt es sich um ein Azol-Antimykotikum mit relativ hoher Lipophilie (berechneter logP-Wert 6,2), das gegen ein breites Spektrum von Dermatophyten sowie einige Hefen und gram-positive Bakterien wirksam ist (Carrillo-Muñoz et al., 2011; Croxtall und Plosker, 2009). Zu den empfindlichen Erregern zählen *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans* und *Cryptococcus neoformans*. Bereits zugelassen sind SRT-haltige

Cremes zur Behandlung von dermalen Infektionen mit Dermatophyten sowie als Vaginalcreme und -ovula zur Behandlung von Vaginalmykosen.

## 2 Allgemeiner Teil

### 2.1 Menschliche Haut

#### 2.1.1 Anatomie

Die Haut erfüllt als größtes Organ des menschlichen Körpers ein breites Spektrum an Funktionen, zu denen der Schutz vor physikalischen und chemischen Einflüssen, die Temperaturregulierung sowie verschiedene sensorische Eigenschaften zählen. Die Schichten der Haut sind von außen nach innen die Epidermis, die Dermis und die Subkutis (Abbildung 2.1). In der Subkutis befindet sich das Unterhaut-Fettgewebe, das neben der Energiespeicherung eine isolierende Funktion hat. Blut- und Lymphgefäße verlaufen ebenfalls in der Subkutis und gehen in das Kapillarnetzwerk der Dermis über. Die Dermis wird in das Stratum papillare und das Stratum reticulare eingeteilt. Während im Stratum papillare Nervenfasern und Strukturelemente für die unterschiedlichen sensorischen Funktionen der Haut zu finden sind, besteht das Stratum reticulare überwiegend aus Kollagenfasern, die der Haut Festigkeit und Elastizität verleihen. In der Dermis entspringen außerdem Haarfollikel, Talgdrüsen und Schweißdrüsen. Die Epidermis besteht hauptsächlich aus Keratinozyten, außerdem sind hier Immunzellen sowie die für die Pigmentierung verantwortlichen Melanozyten zu finden (Mutschler et al., 2007). Der obersten Schicht der Epidermis, dem Stratum corneum, kommt der Hauptteil der Barriereeigenschaften zu.

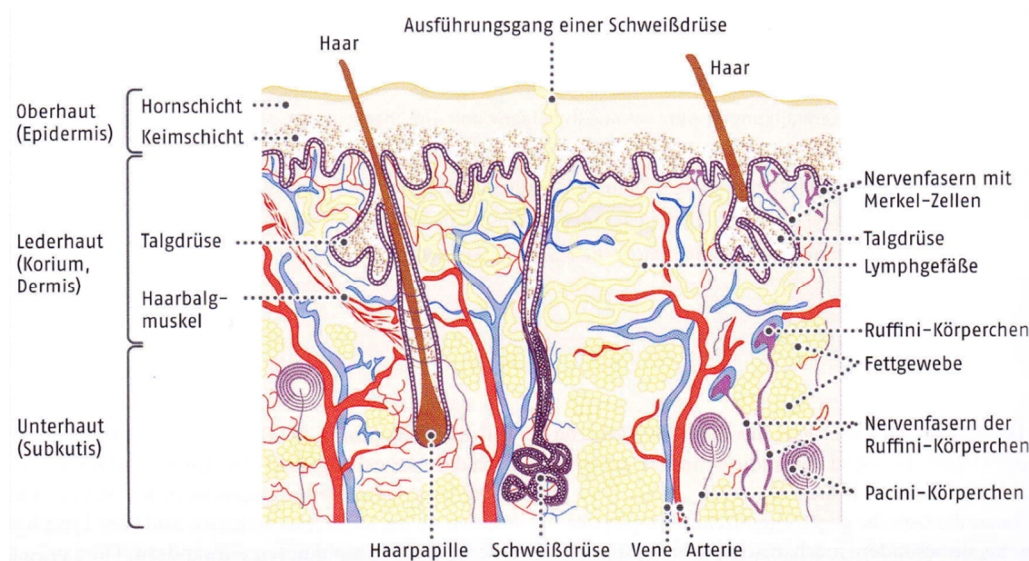


Abbildung 2.1: Aufbau der Epidermis (Mutschler et al., 2013).

### 2.1.2 Stratum corneum (SC)

Das SC besteht aus 10-20 Schichten abgestorbener Keratinozyten, den Korneozyten (Ya-Xian et al., 1999). Die Anzahl der Schichten variiert dabei je nach Körperregion und kann auch deutlich höher oder niedriger liegen, beispielsweise wurden 6 Schichten im Genitalbereich und 86 Schichten an der Ferse gefunden. Entsprechend variiert auch die Dicke des SC, die bei etwa einem halben Mikrometer pro Zellschicht liegt (Holbrook und Odland, 1974). Die Keratinozyten werden im Stratum basale der Epidermis gebildet und werden im Laufe ihrer Differenzierung über das Stratum spinosum und Stratum granulosum in das SC verschoben, wobei sie abflachen und ihren Zellkern verlieren. Die so entstandenen Korneozyten sind von einer Zellhülle aus quervernetztem Protein umgeben und in einer extrazellulären Lipidmatrix eingebettet (Proksch et al., 2008). Diese Struktur wurde in Anspielung auf ihre Barrierefunktion als „brick and mortar“-Modell beschrieben (Nemes und Steinert, 1999), wobei die Korneozyten die Ziegelsteine sind, die von der Lipidmatrix als „Mörtel“ umgeben werden. Diese Lipidmatrix besteht hauptsächlich aus Ceramiden, freien Fettsäuren und Cholesterol. Die Vorstufen der Ceramide sind Glykosphingolipide und Sphingomyeline, die von den Keratinozyten in den lebenden Schichten der Epidermis synthetisiert und in Vesikeln an ihre Umgebung abgegeben werden. Dort kommt es zur enzymatischen Spaltung in die lipophileren Ceramide, die zusammen mit den anderen Bestandteilen der Lipidmatrix Bilayer ausbilden (Downing et al., 1987). Die Fettsäuren werden analog aus Phospholipiden erhalten, Cholesterol wird direkt von den Keratinozyten synthetisiert und sezerniert (Proksch et al., 2008).

Die von den SC-Lipiden gebildeten Bilayer sind wichtige Bestandteile der Barrierefunktion des SC. Daneben wird die Barriere und die mechanische Stabilität von der verzahnten Struktur der Korneozyten erreicht (Elias, 2007), sowie durch Corneodesmosomen und tight junctions. Die Corneodesmosomen sind in einer Anzahl von etwa 400 bis 600 pro Zellseite vorhanden (Lodén und Maibach, 2012) und spielen auch eine Rolle bei der Desquamation, bei der sie durch Proteasen abgebaut werden (Chapman und Walsh, 1990). Durch diesen Prozess erneuert sich das SC etwa alle zwei bis vier Wochen (Egelrud, 2000). Für tight junctions wird vermutet, dass sie eine selektive Barriere darstellen und die Permeation von kleinen, hydrophilen Molekülen durch wässrige Poren ermöglichen. Außerdem sorgen sie für die Polarisierung der Zelle (Brandner et al., 2006).



Der Wassergehalt des SC ist abhängig von der relativen Luftfeuchtigkeit und der Temperatur. Bei 20°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 40% liegt der Wassergehalt bei etwa 5% (Spencer et al., 1975). Wird die Luftfeuchtigkeit erhöht, nimmt der Wassergehalt zunächst linear zu, oberhalb einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60% steigt er exponentiell. Bei 92% relativer Luftfeuchtigkeit erreicht der Wassergehalt etwa 30% (Spencer et al., 1975). Von den äußersten Zellschichten bis zur Grenze zum Stratum granulosum nimmt der Wasseranteil des SC kontinuierlich zu (Peter J. Caspers et al., 2001). Durch den Wasser-Gradienten zwischen Stratum granulosum und Außenwelt erklärt sich auch ein ständiger Wasserverlust der Haut über das SC. Dieser Transepidermale Wasserverlust (TEWL, Transepidermal Water Loss) wird oft als Anhaltspunkt für die Intaktheit der Hautbarriere betrachtet (Rogiers, 2001). Durch okklusive Bedingungen oder hohe Luftfeuchtigkeit wird der Gradient erniedrigt, wodurch der TEWL sinkt und der Wassergehalt des SC auf bis zu 80% ansteigt (Bouwstra et al., 2003). Das Wasser wird von den Korneozyten aufgenommen, wodurch ihre Dicke um etwa 50% zunehmen kann (Richter et al., 2001). Ab einem Anteil von etwa 20% liegen flüssige Wasserdome außerhalb der Korneozyten vor (Bouwstra et al., 2003). Die Wasseraufnahme des SC hat einen Einfluss auf dessen mechanische Eigenschaften, vor allem auf dessen Flexibilität und Elastizität (Wildnauer et al., 1971). Auch die Permeabilität nimmt mit steigendem Wasseranteil zu, was bei Dermatika mit okklusiven Eigenschaften ausgenutzt wird (Björklund et al., 2010). Diese Erhöhung der Permeabilität wurde mit einem Übergang der Lipid-Bilayer von einem flüssigkristallinen zu einem fluiden Zustand in Verbindung gebracht (Alonso et al., 1996; Carruthers und Melchior, 1983). Barry (1987) postulierte, dass die verstärkte Permeation von Arzneistoffen durch eine Absättigung von Wasserstoffbindungsstellen im SC verursacht wird. In trockenem SC interagieren diese Bindungsstellen mit den Arzneistoffen und halten sie so zurück. Durch die Absättigung mit Wasser interagieren die Bindungsstellen nicht mehr mit den Arzneistoffen, wodurch die Diffusionsbarriere herabgesetzt wird. Ein weiterer möglicher Effekt des Wassers kommt durch die Interaktion mit hydrophilen Kopfgruppen der Bilayer zustande: Hierdurch wird die Anordnung der Lipide gestört und es stehen freie Wassermoleküle zwischen den Bilayern zur Verfügung, die eine Diffusion hydrophiler Stoffe über diesen Weg erleichtern (Trommer und Neubert, 2006). Untersuchungen zur Lokalisation des Wassers im SC sprechen allerdings gegen eine Interaktion mit den Bilayern (Williams und Barry, 2004). Welche der

beschriebenen Effekte eine Rolle bei der Permeationsförderung durch Wasser spielen, wird weiterhin diskutiert.

### **2.1.3 Permeation durch das SC**

Aufgrund der oben genannten Barriereigenschaften ist die Diffusion von Arznei- und anderen Stoffen in und durch das SC nur begrenzt möglich. Es gibt mehrere Wege, auf denen Stoffe prinzipiell permeieren können. Für die meisten Stoffe wird eine interzelluläre Permeation als am wahrscheinlichsten beschrieben, bei der sie durch die Lipidmatrix diffundieren. Bei der transzellulären Route wäre eine abwechselnde Diffusion durch hydrophile und lipophile Bereiche nötig, da Schicht um Schicht von Keratinozyten und Lipidmatrix passiert werden muss. Deshalb wird diese Route als unwahrscheinlich betrachtet (Hadgraft, 2004). Für hydrophile Stoffe ist außerdem die Diffusion über die Corneodesmosomen möglich. Weitere Möglichkeiten, die in der Betrachtung der SC-Permeation an Bedeutung gewonnen haben, sind die Wege über Haarfollikel und über Schweißdrüsen (Trommer und Neubert, 2006).

### **2.1.4 Verbesserung der Permeation durch das SC**

Eine Erhöhung der Durchlässigkeit des SC, wie es für viele Arzneistoffe wünschenswert ist, kann durch unterschiedliche physikalische und chemische Methoden erzielt werden. Zu den physikalischen Methoden, die erforscht werden, zählen die Iontophorese, Elektroporation, Sonoporation und die Behandlung mit Mikronadeln (Thong et al., 2007). Auf chemischem Wege gibt es laut Williams und Barry (2004) vier mögliche Prinzipien, nach denen ein permeationsfördernder Stoff die Durchlässigkeit des SC erhöhen kann. Er kann den Diffusionskoeffizienten eines Stoffes im SC erhöhen, die thermodynamische Aktivität des Stoffes im Vehikel erhöhen, den Verteilungskoeffizienten zugunsten des SC gegenüber dem Vehikel erhöhen oder (theoretisch) die Dicke des SC herabsetzen. Die meisten bekannten permeationsfördernden Stoffe erzielen eine Erhöhung des Diffusionskoeffizienten, indem sie auf unterschiedliche Arten mit den SC-Lipiden interagieren (Williams und Barry, 2004).

Wie im Abschnitt 2.1.2 bereits erwähnt, ist Wasser einer der am häufigsten eingesetzten Stoffe, um die Permeabilität des SC zu erhöhen, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen bis heute diskutiert werden. Daneben gibt es eine Vielzahl an Stoffen aus unterschiedlichen chemischen Gruppen, für die permeationsfördernde Effekte bekannt sind. Auf einige von ihnen soll hier kurz eingegangen werden. Kurzkettige Alkohole sind eine der am häufigsten verwendeten Gruppen. Auch hier werden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen, nach denen sie ihre Wirkung erzielen. Als Kosolvenzien können sie zunächst die Löslichkeit von Wirkstoffen in den Vehikeln erhöhen, was indirekt zu einer erhöhten Permeation führt. Studien mit Ethanol und Isopropanol (IPA) haben außerdem ergeben, dass die permeierte bzw. penetrierte Menge an Estradiol mit der permeierten bzw. penetrierten Menge der Alkohole korrelierte (Liu et al., 1991). Dies lässt vermuten, dass die Alkohole bei ihrer Diffusion in das SC den gelösten Wirkstoff mittransportieren. Brinkmann und Müller-Goymann (2003) beobachteten, dass IPA die Fluidität der SC-Lipide beeinflusste, wodurch die Löslichkeit von Wirkstoffen in der Lipidmatrix erhöht werden kann. Auch eine Extraktion von Lipiden aus dem SC ist möglich, was die Barrierefunktion der Lipid-Bilayer herabsetzt (Williams und Barry, 2004).

Ein weiterer Aspekt ist die Verdunstung von flüchtigen Lösemitteln nach Auftragen einer Formulierung auf die Haut, wodurch es zur Bildung von übersättigten Lösungen kommen kann. Die hierdurch erhöhte thermodynamische Aktivität begünstigt die Diffusion aus der Formulierung und in das SC. Für Propylenglykol (PG), den am häufigsten verwendeten Vertreter aus der Gruppe der Glykole, gelten ähnliche Überlegungen wie für die kurzkettigen Alkohole. Auch hier wird ein „solvent drag“ vermutet, da die Menge an PG, das in das SC penetriert, mit der Menge an penetriertem Wirkstoff korreliert (Bonnist et al., 2011). Auch eine Beeinflussung der Bilayerstruktur durch Einlagerung (Brinkmann und Müller-Goymann, 2005) und eine Löslichkeitserhöhung im SC wurden diskutiert (Lane, 2013).

DMSO wird in der Literatur ausführlich als permeationsfördernder Stoff beschrieben. Da es sich um ein aprotisches Lösemittel handelt, wird auch hier vermutet, dass die Hauptwirkung durch die Rolle als Kosolvenz und durch eine Beeinflussung der Verteilung des Wirkstoffes zwischen Haut und Vehikel verursacht wird. Auch eine Beeinflussung der Bilayer-Struktur wurde vermutet (Thong et al., 2007). Allerdings sind für einen permeationsfördernden Effekt relativ hohe Konzentrationen notwendig, bei

denen die Bildung von Erythemen beobachtet wurde (Kligman, 1965). Auch eine geschmackliche Beeinträchtigung beim Auftragen auf und Permeation durch die Haut, die durch Metabolite des DMSO verursacht wird (Santos et al., 2003), schränkt die praktische Anwendung deutlich ein.

Bei Fettsäuren sind zwei Gruppen für die Permeationsförderung besonders interessant: Bei ungesättigten Fettsäuren zeigt eine Kettenlänge von 10-12 Kohlenstoffatomen die größten Effekte (Aungst et al., 1986), bei ungesättigten Fettsäuren ist besonders die Ölsäure ein effektiver Permeationsförderer (Golden et al., 1987). Während der genaue Mechanismus bei den gesättigten Fettsäuren ungeklärt ist, wurde bei Ölsäure festgestellt, dass sie eine eigene Phase innerhalb der Lipidmatrix bildet (Ongpipattanakul et al., 1991). Durch so entstehende Defekte in der Lipidmatrix kann die Permeabilität erhöht werden.

Azone ist das erste Beispiel der gezielten Entwicklung eines permeationsfördernden Stoffes (Stoughton und McClure, 1983). Das Molekül besteht wie die SC-Lipide aus einer hydrophilen Kopfgruppe und einer lipophilen Seitenkette. Durch diese Struktur ist eine Interaktion mit den Bilayern möglich, wodurch es zu einer Erhöhung der Fluidität kommt. Grenzflächenaktive Stoffe, die häufig zur Solubilisierung von Wirkstoffen verwendet werden, können auch Lipide des SC solubilisieren und so die Barriereigenschaften verringern. Allerdings haben anionische und kationische Tenside häufig eine reizende Wirkung auf die Haut, während nichtionische eine geringere permeationsfördernde Wirkung zeigen. Eine Vielzahl weiterer Stoffe, wie zum Beispiel die Pyrrolidonderivate N-Methyl-2-pyrrolidon und 2-Pyrrolidon, wurden auf ihre permeationsfördernden Eigenschaften untersucht. Die Mechanismen sind dabei ähnlich wie die bereits beschriebenen oder nicht vollständig geklärt, daher soll auf die Einzelstoffe hier nicht weiter eingegangen werden.

## **2.2 Menschliche Nägel**

### **2.2.1 Keratin**

Keratine sind eine Gruppe von Strukturproteinen, die entscheidend am Aufbau von Haaren, Nägeln, SC und anderen verhornten Geweben bei Menschen und Säugetieren beteiligt sind. Beim Menschen sind über 50 unterschiedliche Keratintypen

bekannt, die sämtlich einen alpha-helikalen Aufbau besitzen (Schweizer et al., 2006). Die alpha-Helices sind von nicht-helikalen Domänen umgeben (Rogers et al., 2006). Die Keratine beim Menschen werden weiter unterteilt in „weiche“ Haut-Typ-Keratine und „harte“ Haar-Typ-Keratine. Die Unterschiede in den mechanischen Eigenschaften kommen dabei durch unterschiedliche Anteile an schwefelhaltigen Aminosäuren in den nicht-helikalen Domänen zustande. Haar-Typ-Keratine haben einen hohen Anteil an schwefelhaltigen Aminosäuren, die zu einem hohen Vernetzungsgrad führen (Moll et al., 2008). Der isoelektrische Punkt von Keratinen mit niedrigem Schwefelgehalt liegt zwischen 4,9 und 5,4 (Marshall, 1983), somit sind sie bei neutralem pH-Wert negativ geladen.

### **2.2.2 Anatomie**

Der menschliche Nagel ist eine etwa rechteckige, gewölbte Platte, deren Dicke zwischen 0,5mm und 1mm liegt (de Berker et al., 1996; Gunt und Kasting, 2007a). Neben kosmetischen Aspekten hat er Funktionen beim Tasten und Greifen kleiner Objekte und übt eine Schutzfunktion für die Fingerkuppen und Zehen aus. Die Nagelplatte besteht aus abgestorbenen, verhornten Zellen, die in der Nagelmatrix gebildet werden. Während des Nagelwachstums flachen die Zellen ab und verlieren ihren Zellkern. Hauptbestandteil der so gebildeten Nagelplatte ist alpha-Keratin. Dabei sind die alpha-Helices, die eine hohe Kristallinität aufweisen, in eine amorphe Matrix eingebettet. Diese amorphe Matrix ist reich an schwefelhaltigen Aminosäuren, die eine Quervernetzung des Keratins bewirken (Gupchup und Zatz, 1999; Moll et al., 2008). Die Nagelplatte wird je nach Literaturquelle in zwei bis drei Schichten eingeteilt. Die Schichten unterscheiden sich dabei vor allem in Keratin-Typ und Wassergehalt. Kobayashi et al. (1999) unterscheiden zwischen dorsaler, intermediärer und ventraler Nagelplatte. Dabei stellt die ventrale Nagelplatte die Verbindung mit dem unter dem Nagel befindlichen Nagelbett her, während der dorsale Teil aus hartem Keratin besteht und durch eine besonders niedrige Permeabilität für Arzneistoffe gekennzeichnet ist. Die intermediäre Schicht macht zwei Drittel der Dicke des Nagels aus und besteht aus weicherem Keratin mit niedriger Lipophilie (Gupchup und Zatz, 1999; Kobayashi et al., 1999). Die Nagelplatte ist proximal in die Nageltasche eingebettet. Dort befindet sich die Matrix, deren distaler Anteil als halbmondförmige Lunula am unteren Ende der

Nägel sichtbar ist. Die Nagelplatte wird in diesem Bereich vom Eponychium bedeckt, das in die abgestorbene Cuticula übergeht. Seitlich wird sie von der Nagelfalz begrenzt, am Übergang von Nagelplatte und Nagelbett zur Fingerbeere befindet sich das Hyponychium (Piraccini et al., 2013).

Der Wassergehalt der Nagelplatte beträgt bei durchschnittlichen Umgebungsbedingungen etwa 18%. Änderungen im Wassergehalt haben Auswirkungen auf die mechanischen Eigenschaften: Bei Austrocknung werden die Nägel spröde, bei höheren Wassergehalten weicher und opak (Piraccini et al., 2013). Der Lipidgehalt liegt bei unter 5% (Helmdach et al., 2000).

Die Wachstumsrate unterscheidet sich zwischen Finger- und Fußnägeln. Die Fingernägel wachsen etwa drei Millimeter pro Monat, während es bei Fußnägeln nur ein Millimeter pro Monat ist (Piraccini et al., 2013). Schwankungen treten alters- und jahreszeitabhängig auf (Moll, 2016). In Verbindung mit der durchschnittlichen Länge der Nägel errechnet sich, dass ein Fingernagel etwa alle 100-180 Tage erneuert wird, während die Erneuerung bei Fußnägeln 12 bis 18 Monate in Anspruch nimmt (Piraccini et al., 2013). Während die Nagelplatte leblos und nicht durchblutet ist, werden das Nagelbett und die Matrix von einem dichten Netz an Kapillaren versorgt, wodurch das Nagelbett hellrosa erscheint. Eine verminderte Durchblutung wird mit verschiedenen krankhaften Veränderungen des Nagels und reduzierter Wachstumsgeschwindigkeit in Verbindung gebracht (de Berker, 2013).

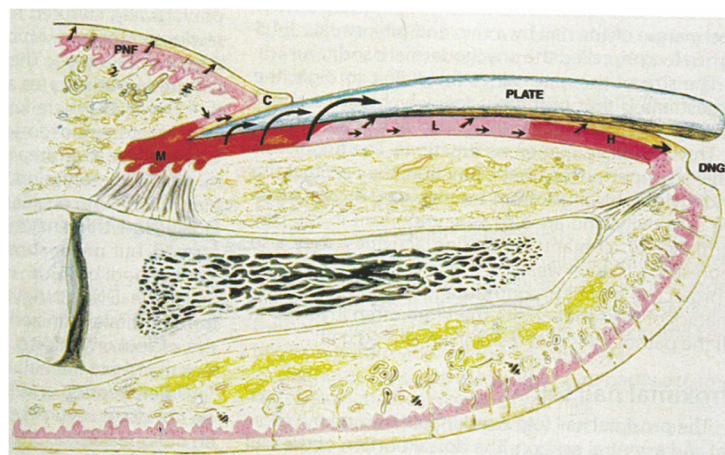


Abbildung 2.2: Aufbau der Nagelplatte (Piraccini et al., 2013). PNF: Proximale Nagelfalz; C: Cuticula; M: Matrix; L: Lunula; H: Hyponychium

### 2.2.3 Permeation durch menschliche Nägel

Der menschliche Nagel stellt aufgrund seiner Dicke und seines dichten Keratinnetzwerkes eine hervorragende Permeationsbarriere gegenüber den meisten Arzneistoffen dar. Die Überwindung dieser Barriere spielt eine wichtige Rolle in der topischen Behandlung von Erkrankungen der Nägel wie Onychomykose und Psoriasis. Hierzu muss jedoch erst bekannt sein, wie sich der Nagel bei der Permeation von Wirkstoffen verhält. Schon früh wurde vorgeschlagen, dass er als hydrophile Gelmembran beschrieben werden kann (Walters und Flynn, 1983). Fraglich war jedoch, ob es basierend auf dem geringen Lipidgehalt auch eine lipophile Permeationsroute gibt, die die Diffusion von lipophilen Stoffen begünstigen würde. Mertin und Lippold (1997b) untersuchten diese Fragestellung anhand einer homologen Reihe von Nikotinsäureestern und fanden, dass der Permeationskoeffizient durch menschliche Nägel nicht vom Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten, wohl aber von der Molekülgröße abhängig war. Auf Basis dieser Beobachtung bestätigten sie die Betrachtung als hydrophile Gelmembran und stellten in diesem Zusammenhang fest, dass der maximale Flux eines permeierenden Stoffes von seiner Löslichkeit abhängt.

In einer neueren Untersuchung von (Baswan et al., 2016), bei der Literaturdaten aus verschiedenen Quellen zusammengetragen wurden, konnte die Abhängigkeit von der Molekülgröße und Unabhängigkeit vom Verteilungskoeffizienten bestätigt werden. Die reine Betrachtung als hydrophile Gelmembran wurde jedoch in Frage gestellt, da zwei mathematische Modelle für eine Permeation durch solche Membranen nicht die Realität der Permeationsdaten durch Nägel abbildeten. Baswan vermutete, dass es zwar keinen lipophilen Permeationsweg gibt, aber die im Nagel enthaltenen Lipide eine Rolle bei der Ausbildung der Permeationsbarriere spielen, die bei der Beschreibung als hydrophile Gelmembran nicht berücksichtigt wird. Außerdem wurde angeführt, dass die Modelle für die Permeation durch Hydrogelmembranen meist von verdünnten Systemen ausgehen, während der menschliche Nagel ein dichtes Keratinnetzwerk aufweist.

Ein weiterer denkbarer Einfluss ist die Keratinbindung des permeierenden Stoffs. Ist diese hoch, wird er eher im Nagel zurückbleiben, als ihn zu durchdringen. Sugiura et al. (2014) führten beispielsweise die von Mertin und Lippold (1997a) nachgewiesene hohe Permeabilität des Antimykotikums Efinaconazol auf dessen geringe

Keratinbindung zurück. Ein weiterer Faktor ist die Ladung bzw. der Dissoziationsgrad des permeierenden Stoffes: Mehrere Untersuchungen fanden, dass eine Dissoziation zu geringeren Permeationskoeffizienten führen. Mertin und Lippold (1997b) führten dies auf die negative Ladung des Keratins und das daraus resultierende Donnan-Gleichgewicht bzw. eine elektrostatische Abstoßung zurück. Kobayashi et al. (2004) widersprachen dieser Hypothese und begründeten die verringerte Permeabilität mit einer Hydratation des permeierenden Stoffes und einem dadurch erhöhten effektiven Molekulargewicht um etwa 100 Dalton.

#### **2.2.4 Verbesserung der Permeation durch menschliche Nägel**

Aufgrund der niedrigen Permeabilität menschlicher Nägel gibt es verschiedenste Versuche, die Barrierefunktion zu verringern. Dies ist auf mechanischem, physikalischem oder chemischem Wege möglich. Mechanische Verfahren wie das Anfeilen oder eine chirurgische Entfernung des gesamten Nagels werden in der Praxis eingesetzt und zielen auf die Verringerung der Diffusionsstrecke bis zum Nagelbett ab (di Chiacchio et al., 2003). Gerade das Feilen der Nägel wird auch in der Selbstmedikation empfohlen (Heumann Pharma, 2018). Wie bereits beim Aufbau des Nagels erwähnt, fanden Kobayashi et al. (1999), dass die äußere Schicht des Nagels besonders wenig permeabel war. Eine Steigerung der Permeation durch Entfernen dieser Schicht erscheint also möglich und sinnvoll. Da die Heilungsraten von Pilzkrankungen unter Anwendung der auf dem Markt befindlichen Präparate jedoch noch immer gering ist und die chirurgische Entfernung ein invasives Verfahren ist, sind andere Wege der Permeationsförderung wünschenswert. Eine große Zahl an physikalischen Verfahren wird in der Forschung getestet und teilweise auch in der Praxis angewandt. Dazu zählen zum Beispiel die Iontophorese, bei der Wirkstoffe mithilfe eines elektrischen Feldes durch den Nagel befördert werden, und das Anätzen (Etching) der Nägel mit Phosphorsäure oder anderen Säuren, wobei Mikroporen entstehen und die Oberfläche angeraut und besser benetzbar wird (Elkeeb et al., 2010). Auch eine Porenbildung oder vollständige Entfernung des Nagels mit Lasern wird erprobt (Gupta et al., 2017). Zu Methoden, die bislang noch wenig erforscht sind, zählen die Phonophorese mit Ultraschall, die Behandlung mit UV-Licht sowie eine photodynamische Therapie mit 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) (Elkeeb et al., 2010). Ein



in den USA auf dem Markt befindliches Produkt ist der PathFormer, mit dem Löcher in den Nagel bis unmittelbar über das Nagelbett gebohrt werden (Salter et al., 2006). Hierdurch soll der Wirkstofftransport bis in das Nagelbett gefördert werden.

Ein wichtiger Faktor bei der Permeabilität menschlicher Nägel ist der Quellungsgrad. Sie können bis zu 30% ihres Trockengewichts an Wasser aufnehmen (Gunt und Kasting, 2007b; Lusiana et al., 2011). Gunt und Kasting (2007a) fanden, dass der Flux von Ketoconazol durch eine Erhöhung der relativen Luftfeuchtigkeit in der Umgebung des Nagels von 15% RH auf 100% RH anstieg. Dabei kam es zwischen 80% und 100% zu einer Verdopplung des Fluxes. Angesichts der niedrigen Wasserlöslichkeit von Ketoconazol und einer starken Bindung des Wassers an Keratin (Gunt und Kasting, 2007b) schlossen sie einen Kotransport des Wirkstoffs mit permeierendem Wasser aus. Sie begründeten die erhöhte Permeabilität stattdessen mit einer Auflockerung der Keratinmatrix und dem dadurch gesteigerten für die Diffusion zur Verfügung stehenden Volumen. Dieser Effekt spielt auch eine Rolle bei der Wirkung diverser chemischer Permeationsförderer, die seit den späten 1990er Jahren zunehmend Aufmerksamkeit in der Forschung bekommen haben.

Thioglykolsäure verbesserte die Permeabilität von drei Modellarzneistoffen unterschiedlicher Lipophilie (Brown et al., 2009). Sie ist in der Lage, Disulfidbrücken des Keratins zu spalten. Es wurde vermutet, dass durch die Spaltung der Disulfidbrücken verstärkt Wasser eingelagert wird und so auch hier eine Auflockerung der Keratinmatrix geschieht. In einer anderen Veröffentlichung wurde sogar vorgeschlagen, die Auswirkung verschiedener Substanzen auf den Quellungsgrad des Nagels als Screening-Methode für permeationsfördernde Stoffe zu nutzen (Khengar et al., 2007). Quintanar-Guerrero et al. (1998) untersuchten den Effekt verschiedener anderer keratolytischer Stoffe auf die Permeation von Miconazolnitrat, Itraconazol und Ketoconazol. Sie fanden, dass nur eine Kombination vom jeweiligen Wirkstoff, einer 15%-igen phosphatgepufferten Papainlösung für einen Tag und einer 20%-igen wässrigen Salicylsäurelösung für zehn Tage einen permeationsfördernden Effekt hatte. Salicylsäure oder Harnstoff (40%) allein zeigten keinen Effekt.

In einer anderen Untersuchung verursachten 2-Mercaptoethanol und N-Acetyl-L-cystein eine erhöhte Quellung von Nagelschnipseln und erhöhten die Permeabilität gegenüber 5-Fluorouracil und Tolnaftat, was wie bei Thioglykolsäure auf einer

Spaltung von Disulfidbrücken beruht (Kobayashi et al., 1998). In einem Vergleich von N-Acetyl-L-cystein, Thioglykolsäure und 2-Mercaptoethanol, die in jeweils gleichen Konzentrationen in der Entwicklung eines antimykotischen Nagellacks getestet wurden, zeigte 2-Mercaptoethanol den stärksten Effekt (Patel und Vora, 2016). Malhotra und Zatz (2002) führten ein Screening verschiedener Thiolgruppen-haltiger Stoffe durch, um weitere mögliche Permeationsförderer zu finden. Dabei benutzten sie die Permeation von Wasser als Marker für die Verringerung der Barriereigenschaften. Eine Kombination von N-(2-Mercaptopropionyl)glycin und Harnstoff stellte sich am effektivsten heraus. Im Gegensatz zur alleinigen Anwendung schien Harnstoff hier also einen synergistischen Effekt zu erzielen. Als weitere Substanz wurde 2-*n*-Nonyl-1,3-dioxolan untersucht, das als Permeationsförderer für SC auf dem Markt ist (Hui et al., 2003). Es erhöhte die Permeation von Econazol durch menschliche Nägel um den Faktor sechs im Vergleich zu einem identischen Nagellack ohne 2-*n*-Nonyl-1,3-dioxolan. Da die Substanz aber selbst kaum in den Nagel permeiert, wird dieser vermutlich nicht direkt beeinflusst. Stattdessen wurde ein Einfluss auf das Vehikel angeführt, da 2-*n*-Nonyl-1,3-dioxolan die Viskosität des Lacks verringerte und dessen Adhäsion förderte, wodurch die Freisetzung des Wirkstoffs verbessert wurde.

Weitere Stoffe, die ohne eine Spaltung von Disulfidbrücken einen Effekt auf die Permeabilität hatten, sind Polyethylenglykole mit einer niedrigen Molekülmasse (200-400Da) (Nair et al., 2010) und N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) (Kerai et al., 2018). Auch hier wurde eine Erhöhung der Wasseraufnahme in die Keratinmatrix festgestellt. Keratolytische Enzyme wurden mit der Vermutung untersucht, dass sie das Keratin teilweise hydrolysieren und somit eine verringerte Barrierefunktion erreichen (Mohorcic et al., 2007). Es zeigte sich in elektronenmikroskopischen Aufnahmen, dass die Nagel-Korneozyten separiert und in ihrer Oberflächenstruktur verändert wurden. Gleichzeitig wurde die Permeation von Metformin-hydrochlorid durch bovine Hufscheiben (BH) als Nagelmodell erhöht.

### **2.2.5 Nagelmodelle**

Permeationsuntersuchungen durch menschliche Nägel ex vivo haben einen wichtigen Einblick in die physikochemischen Vorgänge und die Anforderungen an Wirkstoff und Vehikel gegeben. Für umfangreiche Screenings mit vielen Wirkstoffen und Vehikeln

besteht jedoch das Problem der geringen Verfügbarkeit menschlicher Nägel. Zusätzlich erschwert werden die Versuche durch die Krümmung der Nagelplatte sowie durch inter- und intraindividuelle Unterschiede in den Eigenschaften der Nägel, vor allem der Dicke. Die Entwicklung verschiedener Versuchsvariationen hat die Nutzung von menschlichen Nägeln für ex vivo-Versuche erleichtert. Ein Beispiel dafür sind die eigens für solche Versuche entwickelten Diffusionszellen ChubTur® und TurChub®. ChubTur® ist eine modifizierte Franzelle, in der eine Nagelplatte als Diffusionsbarriere eingespannt werden kann. TurChub® ist eine Weiterentwicklung dieser Zellen, bei der das Seitenrohr zur Probenentnahme entfällt. Stattdessen ist das Akzeptorkompartiment mit infiziertem Agar gefüllt. Durch Diffusion von antimykotischen Wirkstoffen bildet sich eine Inhibitionszone aus, die Rückschluss auf die Permeation des Wirkstoffs zulässt. Die sonst bei Franzellen notwendige Analytik entfällt.

Trotz dieser Verbesserungen von ex vivo Experimenten bleibt die Verfügbarkeit menschlicher Nägel ein Problem. Aus diesem Grund werden bei vielen Untersuchungen bovine Hufscheiben (BH) als Modell für den menschlichen Nagel verwendet (Mertin und Lippold, 1997a; Nogueiras-Nieto et al., 2013; Monti et al., 2011). Sie bestehen ebenfalls aus alpha-Keratinen, unterscheiden sich allerdings in ihren physikochemischen Eigenschaften, beispielsweise der Quellungsfähigkeit (Lusiana et al., 2011). Mertin und Lippold (1997b) untersuchten ausführlich die Permeation von Wirkstoffen unterschiedlicher Lipophilie und Molekülgröße durch menschliche Nägel und BH. Sie stellten fest, dass durch die BH generell mehr Wirkstoff permeierte. Außerdem war die Abnahme der Permeabilität bei steigender Molekülgröße um Faktor 2 geringer ausgeprägt als bei menschlichen Nägeln. Dies wurde mit einer geringeren Dichte des Keratinnetzwerks in der Matrix begründet. Basierend auf ihren Ergebnissen stellten sie eine empirische Formel zur Abschätzung der Permeationskoeffizienten durch Nagel aus Rinderhufdaten auf (Mertin und Lippold, 1997a).

Eine neuere Entwicklung sind Keratinfilme (KF) als alternatives in vitro-Modell für den menschlichen Nagel (Lusiana et al., 2011). Sie werden aus menschlichen Haaren hergestellt, wobei mittels der Shindai-Methode eine Keratin-Nanodispersion hergestellt wird, die nach Trocknung und Verbacken transparente und wasserunlösliche Filme ergibt. Menschliches Haar als Keratinquelle hat dabei den

Vorteil, dass es relativ einfach verfügbar ist und Haar-Typ-Keratin auch in Nägeln vorkommt, sodass die physikochemischen Eigenschaften in vielen Punkten ähnlich sind (Baden et al., 1973). Unterschiede gibt es wie auch bei BH unter anderem beim Quellungsverhalten. Während BH mit bis zu 45% ihres Trockengewichts jedoch mehr Wasser aufnehmen können als menschliche Nägel, liegt der Wert bei KF mit 5% darunter (Lusiana et al., 2011). Permeationsuntersuchungen mit Testsubstanzen unterschiedlicher Lipophilie und Molekülgröße ergaben ähnliche Permeationseigenschaften wie bei BH. Nur die Permeabilität des lipophilen Markers Rhodamin b war bei KF signifikant höher als bei BH (Faktor 1,8) (Lusiana et al., 2011). Dies wurde auf eine höhere Affinität des Haarkeratins aufgrund unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzung zurückgeführt. Permeationsuntersuchungen mit lipophilen Stoffen müssen daher mit Vorsicht betrachtet werden, da sie die Permeabilität überschätzen könnten. In Untersuchungen von Täuber und Müller-Goymann (2015b) lag der Permeationskoeffizient von CPX aus verschiedenen Formulierungen durch KF zwischen 1,4 und 2,3 mal höher als durch BH.

## **2.3 Pilzinfektionen des Nagels und der Haut**

### **2.3.1 Onychomykose**

Zu den Symptomen einer Pilzinfektion der Fuß- oder Zehennägel zählen Verfärbung, Verdickung und Brüchigkeit bis hin zur vollständigen Zerstörung der Nagelplatte (Onycholysis). Als häufigste Begleiterscheinungen gaben Patienten Beschwerden beim Gehen und Schmerzen an, was eine Beeinflussung der Lebensqualität zur Folge hat und deutlich macht, dass eine Behandlung grundsätzlich anzuraten ist (Abeck et al., 2000). Die globale Prävalenz der Onychomykose wurde anhand mehrerer epidemiologischer Studien in unterschiedlichen Ländern auf 5,5% geschätzt, wobei einzelne Studien Prävalenzen zwischen 1,1% und 72% berichten (Gupta et al., 2017). Dabei spielen die Nachweiskriterien für eine Pilzinfektion sowie die Auswahl der Probanden eine Rolle. Zum Nachweis der Erreger stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung, wobei die Auflösung von Nagelproben in Kaliumhydroxid und ein anschließender mikroskopischer Nachweis am häufigsten eingesetzt wird. Die Kombination einer Kultivierung zum Nachweis des Erregertyps mit Anfärbemethoden erhöht die Anzahl erfolgreich nachgewiesener Pilzinfektionen, bei Studien mit nur einer

Nachweismethode fällt die Prävalenz entsprechend niedriger aus. Bei der Auswahl der Patienten ist eine für die Gesamtbevölkerung repräsentative Stichprobe nur schwer zu erreichen, beispielsweise liegt die Prävalenz in Krankenhaus-basierten Studien etwa doppelt so hoch wie in Studien, die außerhalb von Krankenhäusern durchgeführt wurden (Sigurgeirsson und Baran, 2014). In der Foot-Check-Studie, in der Besucher von dermatologischen Praxen in Deutschland unabhängig von ihrem Vorstellungsgrund auf Pilzinfektionen der Nägel untersucht wurden, lag die Prävalenz bei 12,4% (Abeck et al., 2000). Dabei stieg die Anzahl der Betroffenen kontinuierlich mit dem Alter, in der Gruppe der über 65-jährigen waren es über 40% (Abbildung 2.3). Diese Altersabhängigkeit wurde auch in anderen Studien beobachtet und wird vermutlich einerseits durch physiologische Veränderungen im Alter verursacht, andererseits durch eine höhere Zahl von Begleiterkrankungen wie Psoriasis und Diabetes mellitus, die das Risiko einer Pilzinfektion erhöhen (Klaassen et al., 2014; Dogra et al., 2002). Auch ein Geschlechterunterschied wurde festgestellt, Männer sind häufiger betroffen als Frauen. Dies wurde mit einer häufigeren Benutzung von Gemeinschaftsduschen begründet, bedingt durch höhere sportliche Aktivität und Berufe mit schweren körperlichen Tätigkeiten (Burzykowski et al., 2003). Weitere Risikofaktoren sind familiäre Disposition sowie Verletzungen des Nagels und der umgebenden Haut (Abeck et al., 2000; Burzykowski et al., 2003). Mögliche Erreger finden sich sowohl in der Gruppe der Dermatophyten als auch bei Hefen und Schimmelpilzen, wobei die Dermatophyten mit 68%-82% in Deutschland den größten Anteil ausmachen (Abeck et al., 2000; Mügge et al., 2006). Unter den Dermatophyten ist *Trichophyton rubrum* mit 91% der häufigste Erreger, gefolgt von *Trichophyton interdigitale* (Mügge et al., 2006). Hefen machen den Großteil der weiteren gefundenen Erreger aus, 90% davon verteilen sich auf die Candida-Arten *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* und *C. albicans*. Auch Trichosporon-Arten sind mit etwa 10% vertreten (Mügge et al., 2006).

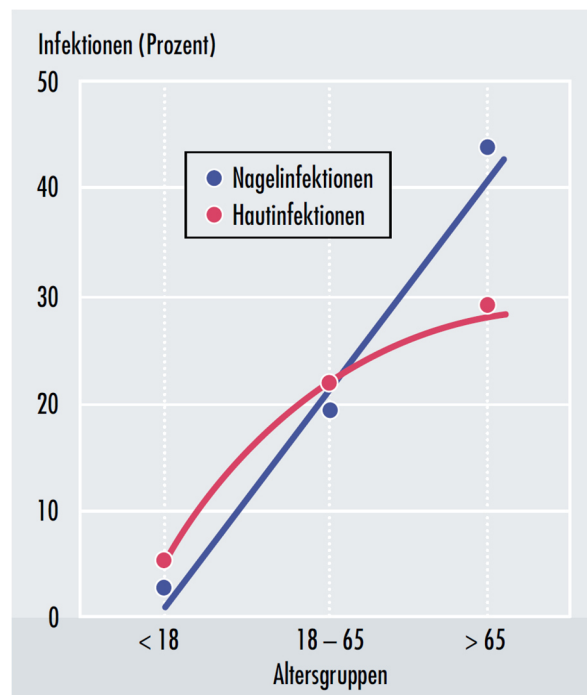


Abbildung 2.3: Prävalenz von Haut- und Nagelpilzinfektionen in unterschiedlichen Altersgruppen (Abeck et al., 2000).

### 2.3.2 Behandlung der Onychomykose

Die Behandlung einer Nagelpilzinfektion ist aus verschiedenen Gründen angeraten: Eine unbehandelte Infektion kann zu den oben genannten Komplikationen wie Schmerzen und Einschränkungen der Fortbewegung führen. Aber auch kosmetische Aspekte sind in Betracht zu ziehen, da sie bei vielen Patienten als nicht unerhebliche Einschränkung der Lebensqualität empfunden werden (Milobratović et al., 2013). Bei der Behandlung stellt sich zunächst die Frage, welche Endpunkte betrachtet werden. Für den Patienten sind Beschwerdefreiheit und das Nachwachsen einer intakten Nagelplatte als Ziele zu nennen, aus Sicht des Untersuchenden kann die Abwesenheit von Pilzzellen als Kriterium herangezogen werden. Beide Endpunkte sind jedoch unabhängig voneinander zu betrachten: Eine vollständige Wiederherstellung der Nagelplatte ist auch bei vollständiger Abwesenheit der Erreger nicht immer zu erreichen, da Nagelbett und -matrix durch die Infektion permanent beschädigt sein können (Gupta und Studholme, 2016). Auf der anderen Seite sind auch in scheinbar gesunden Nägeln häufig noch Erreger nachweisbar, die nach der Behandlung zu einer Reinfektion führen können. Bei der Bewertung von unterschiedlichen

Behandlungsansätzen ist deshalb relevant, welcher Endpunkt betrachtet wird – Das klinische Bild, die Abwesenheit von Erregern oder die Kombination von beidem. Beim klinischen Bild wird aufgrund der möglichen permanenten Schädigung des Nagels auch eine Verbesserung der Symptome als Erfolg gewertet (Gupta und Studholme, 2016).

Grundsätzlich stehen für die Behandlung der Onychomykose sowohl perorale als auch topische Präparate zur Verfügung. Bei der systemischen Therapie werden Griseofulvin, Terbinafin, Itraconazol und Fluconazol eingesetzt. In einer Metaanalyse der Cochrane Collaboration wurden für Terbinafin mykologische Heilungsraten zwischen 48% und 95% berichtet. Die Heilungsraten lagen signifikant höher als in Studien mit Griseofulvin und Itraconazol, weshalb Terbinafin als Mittel der Wahl vorgeschlagen wurde (Haugh et al., 2002). Neben gastrointestinalen Nebenwirkungen ist eine Schädigung der Leber möglich, weshalb Leberfunktionstest während der Therapie empfohlen werden (Thomas et al., 2010).

Für die topische Therapie sind auf dem deutschen Markt Nagellacke mit den Wirkstoffen Amorolfen und CPX sowie Cremes mit Bifonazol und Harnstoff erhältlich (Seebacher und Brasch, 2006). Die lokale Therapie erzielt im Vergleich zur systemischen niedrigere Heilungsraten (de Berker, 2009), gleichzeitig sind Nebenwirkungs- und Interaktionspotential kaum vorhanden. Sie wird deshalb bei milden bis moderaten Fällen eingesetzt, während die systemische Therapie bei schwereren Verläufen indiziert ist (Elkeeb et al., 2014). Die topische Therapie ist außerdem bei Patienten geeignet, bei denen durch Einnahme anderer Pharmaka das Interaktionspotential hoch ist oder bei denen die systemische Therapie aufgrund von Vorerkrankungen kontraindiziert ist. Ein Vergleich der topischen Formulierungen auf dem Markt ist schwierig, da es nur wenige Studien gibt und sich die Kriterien für eine mykologische oder vollständige Heilung wie zuvor beschrieben deutlich unterscheiden können. In der Literatur finden sich mykologische Heilungsraten von 29% bis 36% für CPX (8% Nagellack) (Gupta et al., 2000) 60% bis 76% für Amorolfen (5% Nagellack) (Lauharanta, 1992; Reinel, 1992) und 65% für die Kombination Bifonazol / Harnstoff (1% / 40% Creme) (Tietz et al., 2013). Auch eine Kombination von systemischer und lokaler Therapie zur Erzielung besserer Heilungsraten wurde vorgeschlagen. Baran et al. (2007) berichteten eine signifikante Überlegenheit einer gleichzeitigen Behandlung mit peroralem Terbinafin und Amorolfen Nagellack im Vergleich zu peroralem

Terbinafin allein. Auch andere Kombinationen zeigten Verbesserungen in mykologischen und klinischen Heilungsraten (Baran und Kaoukhov, 2005), sodass diese Therapieerweiterung zu Beginn einer Behandlung in Betracht gezogen werden sollte.

Zu den nicht-pharmakologischen Therapiemöglichkeiten zählt die chirurgische Entfernung der betroffenen Nägel, was nur bei einer geringen Anzahl betroffener Nägel praktikabel ist. Nachteilig ist die unter 2.2.4 erwähnte höhere Invasivität, zudem finden Studien keinen deutlichen Vorteil des chirurgischen Eingriffs (Grover et al., 2007). Das Anfeilen der Nägel zur Verbesserung der Permeation wird vor Applikation von antimykotischen Nagellacken empfohlen (Heumann Pharma, 2018). Eine interessante Entwicklung ist die Behandlung mit Lasern, die das Pilzmyzel thermisch zerstören sollen. Dies kann als Monotherapie oder in Kombination mit topischen Arzneistoffen geschehen. Ein systematischer Review berichtet von mykologischen Heilungsraten von 70% und vollständigen Heilungsraten von 7%. Da die Unterschiede zwischen einzelnen Studien jedoch sehr groß sind, kann die Effektivität im Vergleich zu etablierten Behandlungsmethoden nicht abschließend beurteilt werden (Yeung et al., 2019). Auch die photodynamische Therapie wurde untersucht, hier ist die Anzahl der Studien jedoch noch geringer (Sotiriou et al., 2010). Die Wahrscheinlichkeit, nach erfolgreicher Behandlung erneut von einer Nagelpilzinfektion betroffen zu sein, ist relativ hoch. Die Rückfallrate lag nach 12 Monaten zwischen 8% und 17% und nach 36 Monaten bei 22% (Epstein, 1998; Tosti et al., 1998). Pilzsporen können im scheinbar gesunden Nagelmaterial sowie in durch eine Ablösung des Nagels entstandenen Lufträumen verweilen. Um eine erneute Ausbreitung zu vermeiden, muss mindestens bis zur vollständigen Erneuerung der Nagelplatte weiter therapiert werden, unter Berücksichtigung des langsamen Wachstums können dies bei Fußnägeln 12 bis 18 Monate sein (Gupta et al., 2017).

### **2.3.3 Tinea pedis**

Tinea Pedis ist nach der Onychomykose die zweithäufigste Pilzinfektion beim Menschen (Drakensjö und Chryssanthou, 2011). Die Prävalenz in der Gesamtbevölkerung von Stockholm lag bei 4,4% (Drakensjö und Chryssanthou, 2011), in Madrid waren 2,9% betroffen (Perea et al., 2000). Sie schwankt jedoch stark



je nach Bevölkerungsgruppe und Risikofaktoren. Die Risikofaktoren sind ähnlich wie bei der Onychomykose, zu ihnen zählen Verletzungen, okklusive Bedingungen durch Fußbedeckungen sowie häufige Kontakte in Barfußbereichen. Aufgrund dieser Faktoren sind Bevölkerungsgruppen wie Marathonläufer (Lacroix et al., 2002), Minenarbeiter (Götz, 1964) oder Soldaten (Heber et al., 1975) besonders häufig betroffen. Männer sind auch hier häufiger infiziert als Frauen. Die Altersgruppe von 31-60 Jahren zeigte bei Drakensjö und Chryssanthou (2011) die höchste Prävalenz, gefolgt von den über 60-jährigen und 18- bis 30-jährigen. In der Foot-Check Studie wurde eine mit dem Alter steigende Prävalenz beobachtet, die jedoch im Gegensatz zur Onychomykose bei der Gruppe der über 65-jährigen ein Plateau erreichte (Abbildung 2.3). Die Erreger sind hauptsächlich Dermatophyten, unter denen in Deutschland die Gattung *Trichophyton* mit 96,1% der Infektionen dominiert (Tietz et al., 1995). Innerhalb dieser Gattung ist *Trichophyton rubrum* mit 82,7% der häufigste Vertreter. Außerhalb der Gruppe der Dermatophyten wurden die Hefen *Candida parapsilosis* und *Candida albicans* mit 8,7% und 8,2% aller Infektionen am häufigsten gefunden (Tietz et al., 1995).

### 2.3.4 Behandlung der Tinea pedis

Für die Behandlung der Tinea pedis wird aufgrund des im Vergleich zur Onychomykose unproblematischeren Wirkstofftransports in die Haut und aufgrund des guten Nebenwirkungsprofils die topische Therapie bevorzugt. Nur bei Sonderformen wie der hyperkeratotischen Tinea pedis oder bei einer nicht ausreichenden Wirksamkeit topischer Präparate wird auch die systemische Therapie empfohlen (Seebacher und Korting, 2008). Bei den topisch zur Verfügung stehenden Wirkstoffen, zu denen verschiedene Azol-Derivate, Terbinafin, Naftifin, CPX und Amorolfen zählen, konnten keine Unterschiede in mykologischer Heilungsrate oder Nebenwirkungsprofil festgestellt werden. Die Behandlungsdauer sollte drei bis vier Wochen über die klinische Heilung hinausgehen, um eine erneute Infektion durch verbleibende Pilzsporen sicher auszuschließen (Seebacher und Korting, 2008). Für eine 1%ige Terbinafin-Lösung wurde nachgewiesen, dass eine einwöchige Behandlung für eine vollständige Heilung ausreicht. Dies wurde auf die fungiziden Eigenschaften von Terbinafin zurückgeführt (Schäfer-Korting et al., 2008). In der systemischen Therapie

reicht die Datenlage für einen systematischen Vergleich der Wirkstoffe nicht aus. Es ist jedoch bekannt, dass Terbinafin dem Griseofulvin überlegen ist und dass eine Behandlung mit Terbinafin oder Itraconazol besser ist als eine Behandlung mit Placebo (Bell-Syer et al., 2012).

### **2.3.5 Gleichzeitige Infektion mit Tinea pedis und Onychomykose**

Tinea pedis und Onychomykose treten häufig gleichzeitig auf. In einer Untersuchung von Onychomykose-Patienten waren 33,8% auch von Tinea pedis betroffen (Szebietowski et al., 2006), bei Betrachtung von Patienten mit Tinea pedis lag die Häufigkeit einer gleichzeitigen Onychomykose sogar bei 59% (Ogasawara et al., 2003). Aufgrund des ähnlichen Erregerspektrums können pilzbefallene Nägel die umliegende Haut infizieren und umgekehrt. Um Reinfektionen und eine Ausbreitung auf andere Körperregionen zu verhindern, sollte deshalb auf das Vorliegen einer gleichzeitigen Infektion geachtet und entsprechend behandelt werden.

## **2.4 Entwicklung antimykotischer Poloxamer 407-basierter Formulierungen**

### **2.4.1 Poloxamer 407 (P407)**

Poloxamere werden seit den 1970er Jahren in der Literatur beschrieben und für unterschiedlichste pharmazeutische Zwecke verwendet. Es handelt sich um Block-Copolymere, die durch Copolymerisation von Ethylenoxid und Propylenoxid in Anwesenheit von Natrium- oder Kaliumhydroxid als Katalysator hergestellt werden (Schmolka, 1972). Dabei entstehen abwechselnde Polyoxyethylen- und Polyoxypropylenblöcke (Abbildung 2.4), die resultierenden Polymere haben je nach Länge der Blöcke unterschiedliche physikochemische Eigenschaften. Zur Unterscheidung wird eine dreistellige Zahl vergeben, wobei die ersten beiden Ziffern multipliziert mit 100 die ungefähre molare Masse des Polyoxypropylen-Anteils angeben und die letzte Ziffer multipliziert mit 10 den prozentualen Massenanteil des Polyoxyethylen-Anteils. Demnach ist bei P407 die molare Masse des Polyoxypropylen-Anteils 4000g/mol und der Massenanteil an Polyoxyethylen beträgt 70%. Je nach Länge der Blöcke handelt es sich bei Raumtemperatur um Flüssigkeiten, halbfeste

Substanzen oder Feststoffe. In Konzentrationen ab  $10^{-5}\%$  bis  $10^{-4}\%$  bilden die Poloxamere Mizellen aus, wodurch sich ihre solubilisierenden Eigenschaften erklären (Escobar-Chávez et al., 2006). In höheren Konzentrationen von 20% bis 30% bilden sich Hydrogele, die als drug-delivery-Systeme für unterschiedliche Anwendungen erforscht wurden. Besonders interessant ist dabei das Thermogelieverhalten der Gele: Bei niedrigen Temperaturen sind die Systeme flüssig, bei Temperaturerhöhung findet eine Gelierung statt. Dies ermöglicht einerseits eine verzögerte Wirkstofffreisetzung, andererseits können die Formulierungen in flüssigem Zustand appliziert werden und verbleiben dann nach Gelbildung am Applikationsort, wodurch eine Wirkstofffreisetzung über einen längeren Zeitraum möglich ist. Zu Anwendungen, die in der Literatur beschrieben sind, zählen Zubereitungen zur Anwendung auf der Haut, im Auge oder im Rektum (Escobar-Chávez et al., 2006). Auch Injektionszubereitungen sind möglich. Vorteilhaft ist dabei die geringe Toxizität der Poloxamere, wobei P407 als einer der unbedenklichsten Vertreter eingestuft wird (Schmolka, 1972). Mit einem HLB-Wert von 22 handelt es sich um ein relativ hydrophiles Tensid (Moghimi und Hunter, 2000).

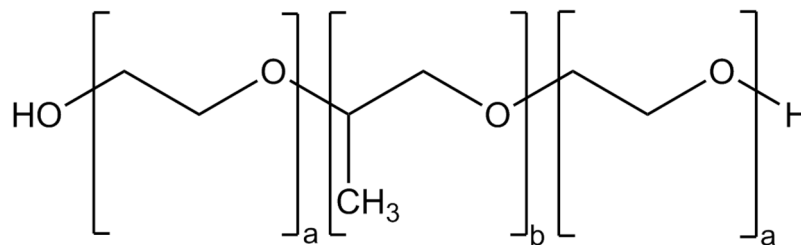


Abbildung 2.4 Chemische Struktur der Poloxamere.

#### 2.4.2 Thermogelieverhalten

Grundvoraussetzung für die Gelierung von Poloxamer-Lösungen ist die Ausbildung von Mizellen, die neben der Konzentration von der Temperatur abhängt (Lenaerts et al., 1987). Bei niedrigen Temperaturen sind die einzelnen P407-Ketten von einer Hydrathülle umgeben, durch Temperaturerhöhung werden die Ketten dehydratisiert (Wanka et al., 1990). Dieser Effekt ist bei den Polyoxypropylen-Blöcken stärker ausgeprägt als bei den Polyoxyethylen-Blöcken, in der Folge lagern sie sich zusammen und bilden den hydrophoben Kern der Mizellen (Abbildung 2.5). Bei

weiterer Temperaturerhöhung steigt die Anzahl der gebildeten Mizellen. Ist eine ausreichende Menge erreicht, lagern sie sich zu einem kubischen Netzwerk zusammen, wodurch die Gelierung stattfindet (Wanka et al., 1990). Bei Konzentrationen von 20% bis 40% in Wasser bildet sich eine kubisch-flächenzentrierte Packung der Mizellen aus, bei höheren Konzentrationen eine kubisch-raumzentrierte (Liu und Chu, 2000). Die Temperatur, ab der eine Gelierung stattfindet, ist der Thermogelierungspunkt (TGP). Er kann durch oszillationsrheologische Untersuchungen bestimmt werden.

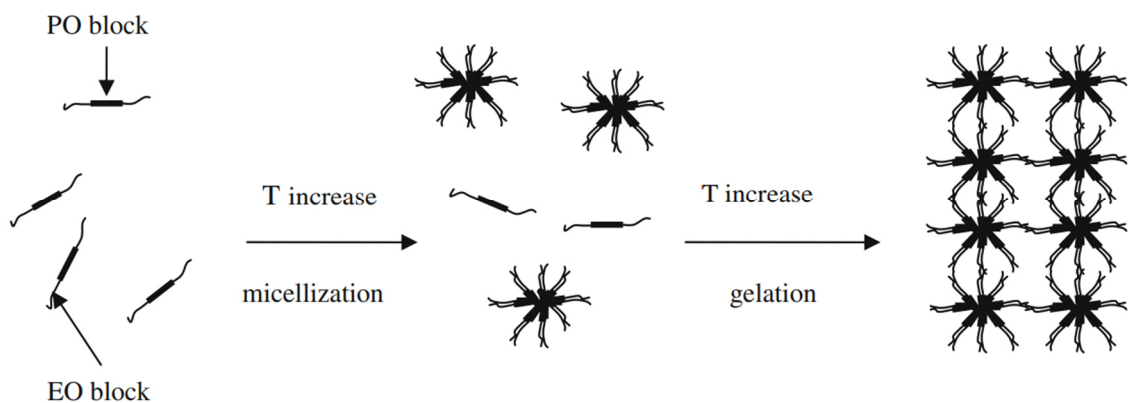


Abbildung 2.5: Temperaturabhängige Mizellbildung und Gelierung von Poloxameren (Dumortier et al., 2006).

### 2.4.3 P407-basierte Formulierungen

Eine der Formulierungen, die auf Basis von P407 entwickelt wurde, ist das sogenannte Thermogel (Grüning und Müller-Goymann, 2008). Dabei handelt es sich um eine Zubereitung zur topischen Anwendung, die bei Kühlschranktemperatur flüssig ist und beim Auftragen auf die Haut geliert. Durch die Gelbildung verbleibt das Thermogel an der Applikationsstelle und kann so eine längere Einwirkungsdauer erzielen. Es handelt sich um ein Fünfkomponentensystem mit den Bestandteilen P407, Miglyol 840®, IPA, Dimethylisobutyl (DMIS) und Wasser. In Nachfolgearbeiten wurde Miglyol 840® durch mittelkettige Triglyceride (MKT) und DMIS durch Propylenglykol ersetzt (Schmid, 2016; Täuber und Müller-Goymann, 2014). Die Eigenschaften des Thermogels wurden mit verschiedenen Wirkstoffen untersucht, wobei die Permeationseigenschaften durch humanes SC im Vordergrund standen. Es konnte gezeigt werden, dass die Permeation von 5-ALA durch das Thermogel begünstigt wird, was für die photodynamische

Therapie der aktinischen Keratose relevant ist (Grüning und Müller-Goymann, 2008). In weiteren Arbeiten wurden die Mischungsverhältnisse der fünf Komponenten weiter variiert, wodurch die Permeation von 5-ALA weiter verbessert wurde (van Hemelrijck und Müller-Goymann, 2012). Auch für die Permeation von Lidocain und Ibuprofen waren die Thermogelvarianten geeignet (Schmid, 2016; van Hemelrijck, 2012). Außerdem wurde die Permeation antimykotischer Wirkstoffe durch SC und Nagelmodelle untersucht, die verwendeten Wirkstoffe waren TBF und CPX (Lusiana et al., 2013; Täuber und Müller-Goymann, 2014). Dabei zeigten flüssige Variationen die günstigsten Permeationseigenschaften sowohl durch SC als auch durch Nagelmodelle (Täuber und Müller-Goymann, 2015b). In einem infizierten Haut- und Nagelmodell wurde eine vollständige Wachstumshemmung des Erregers *Trichophyton rubrum* erzielt, was den Einsatz bei Haut- und Nagelpilzinfektionen als vielversprechend aussehen lässt (Täuber und Müller-Goymann, 2015a, 2016).

#### 2.4.4 Sertaconazol (SRT)

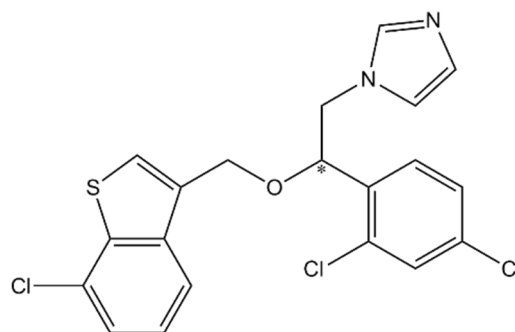


Abbildung 2.6: Chemische Struktur von Sertaconazol.

Sertaconazol ist ein Antimykotikum aus der Gruppe der Imidazole mit breitem Wirkspektrum. Das Molekulargewicht beträgt 437,77g/mol. Aufgrund der hohen Lipophilie (logP-Wert 6,2) wird es zur Löslichkeitsverbesserung meist als Nitratsalz eingesetzt. Sertaconazol wirkt über eine Hemmung der Ergosterol-Biosynthese, indem es die Demethylierung der Vorstufe Lanosterol durch die 14 $\alpha$ -Demethylase hemmt (Agut et al., 1992a). Zusätzlich bindet es an Lipide in der Pilz-Zellmembran (Agut et al., 1992b). Empfindliche Erreger sind unter anderem die Dermatophyten *Trichophyton rubrum* und *Trichophyton mentagrophytes*, die Hefen *Candida albicans* und

*Cryptococcus neoformans* sowie einige Schimmelpilze und gram-positive Bakterien (Palacín et al., 1992). Die minimalen Hemmkonzentrationen wurden zwischen 0,35µg/ml und 5,04µg/ml für Hefen und zwischen 0,24µg/ml und 2µg/ml für Dermatophyten angegeben (Palacín et al., 1992). Bei höheren Konzentrationen zwischen 0,5µg/ml und 16µg/ml zeigte Sertaconazol auch fungizide Eigenschaften (Palacín et al., 1992). Croxtall und Plosker (2009) merkten an, dass die Versuchsbedingungen sowie die Errechnung dieser Werte sich unterschieden und nicht immer mit heutigen Standardmethoden vergleichbar sind. In einer neueren Studie mit einer breiteren Auswahl an Stämmen von *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* und *Epidermophyton floccosum* betrug das geometrische Mittel der minimalen Hemmkonzentration 0,26µg/ml und der minimalen fungiziden Konzentration 2,26µg/ml (Carrillo-Muñoz et al., 2011). Eine antientzündliche und juckreizstillende Wirkung wurde im Mausmodell beobachtet (Liebel et al., 2006), was ein Zusatznutzen bei der Behandlung von Pilzinfektionen wäre und den Wirkstoff auch bei entzündlichen Hauterkrankungen interessant macht. In einem Vergleich von einer 2%igen Sertaconazol-haltigen Creme mit einer 1%igen Hydrocortison-Formulierung war die Linderung der Symptome einer atopischen Dermatitis nach einem Monat in beiden Fällen vergleichbar (Saki et al., 2013). Eine andere Studie fand keinen Effekt von Sertaconazol auf chronischen Juckreiz bei Patienten mit atopischer Dermatitis im Vergleich zum Vehikel (Ständer et al., 2015). Für eine abschließende Beurteilung erscheint die Studienlage nicht ausreichend. Auf dem Markt finden sich Cremes und Sprays zur Behandlung von Pilzinfektionen der Haut sowie Vaginalovula und -cremes zur Behandlung von vaginalen Candida-Infektionen. In der Regel sind 2% (m/m) Sertaconazolnitrat enthalten. Ins Blut wird Sertaconazol nicht aufgenommen, nach 13 Tagen topischer Behandlung konnte weder dort noch im Urin Wirkstoff nachgewiesen werden (Farré et al., 1992).

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Material**

##### **Sertaconazolnitrat**

Sertaconazol ist ein Antimykotikum aus der Gruppe der Imidazole, das aufgrund seiner geringen Löslichkeit in der Regel als Nitratsalz verwendet wird. Es handelt sich um eine weiße, kristalline Substanz mit einer molaren Masse von 500,78g/mol (Nitratsalz) und einem Schmelzpunkt zwischen 158°C und 160°C (Albet et al., 1992). SRT wurde von Dr. Pfleger Arzneimittel GmbH (Bamberg) erhalten, der Hersteller war Ferrer International S. A. (Barcelona, Spanien).

##### **Poloxamer 407**

P407 ist ein Block-Copolymer, das als Tensid und Gelbildner eingesetzt wird. In dieser Arbeit wurde es als Gelbildner bzw. Konsistenzgeber sowie zur Solubilisation von SRT verwendet. Für weitere Details zu den Eigenschaften siehe Abschnitt 2.4.1. P407 wird unter den Handelsnamen Pluronic F127 (Hersteller BASF), Kolliphor 407 (Hersteller BASF) und Synperonic PE/F 127 (Hersteller Croda International plc) vertrieben. Da sich die Eigenschaften, vor allem die Konsistenz der resultierenden Gele, bei unterschiedlichen Herstellern unterscheiden kann (van Hemelrijck, 2012), wurde für diese Arbeit ausschließlich Kolliphor 407 vom Hersteller BASF verwendet. Es wurde als Spende von Firma Dolorgiet GmbH & Co. KG erhalten.

##### **Mykosert® Spray**

Mykosert® Spray ist eines der SRT-haltigen Arzneimittel, die auf dem deutschen Markt zugelassen sind. Die Wirkstoffkonzentration der Sprühformulierung beträgt 2% (m/V), weitere Bestandteile sind Glycerinformal, Ethanol 96% (V/V) und Propylenglykol (Dr. Pfleger Arzneimittel GmbH, 2015). Anwendungsgebiete sind Pilzinfektionen der Haut mit Dermatophyten sowie Pityriasis versicolor.

**Ciclopoli®**

Ciclopoli® ist ein Ciclopirox-haltiger Nagellack, der zur Behandlung der Onychomykose zugelassen ist. Die Wirkstoffkonzentration beträgt 8%, weitere Bestandteile sind Ethylacetat, Ethanol 96% (V/V), Cetylstearylalkohol, Hydroxypropylchitosan und gereinigtes Wasser (Almirall Hermal GmbH, 2017). Ciclopoli® wurde bei mehreren Versuchen als Referenz verwendet, für die eine Wirksamkeit in der Behandlung der Onychomykose nachgewiesen ist.

**Wasser**

Wasser wurde, sofern nicht anders vermerkt, in bidestillierter Qualität verwendet.

**Isopropanol, Propylenglykol und mittelkettige Triglyceride**

Isopropanol, Propylenglykol und mittelkettige Triglyceride wurden von der Firma Fagron (Barsbüttel) bezogen.

**Weitere Substanzen**

Die Bezugsquellen aller weiteren verwendeten Materialien werden in den jeweiligen Abschnitten der Methoden (3.2) beschrieben.

**3.2 Methoden****3.2.1 Zusammensetzung und Nomenklatur der Formulierungen**

Die Zusammensetzung der Formulierungen basiert auf den Arbeiten von Täuber und Müller-Goymann (2016) sowie den Vorgängerarbeiten, die auf die von Grüning und Müller-Goymann (2008) entwickelte Thermogel-Rezeptur zurückgehen. Es handelt sich um 5-Komponenten-Systeme mit den Bestandteilen P407, MKT, IPA, PG und Wasser. Die als „wirkstoffhaltig“ bezeichneten Formulierungen enthielten außerdem SRT. Jeweils zwei der fünf Bestandteile der Grundlage wurden in Anlehnung an Grüning und Müller-Goymann (2008) in einem festen Mischungsverhältnis verwendet.



P407 und MKT wurden im Verhältnis 4:1 eingesetzt, IPA und PG im Verhältnis 1:1. Die resultierenden Zusammensetzungen konnten in einem pseudoternären Mischungsdreieck (Abbildung 3.1) dargestellt werden. Zusätzlich sollten die festen Mischungsverhältnisse exemplarisch variiert werden, um den Einfluss auf die physikochemischen Eigenschaften zu beurteilen. Das Verhältnis P407/MKT wurde nach 3:2 verändert und das Verhältnis IPA/PG nach 1:2 und 2:1, sodass drei weitere Mischungsdreiecke erstellt werden konnten.

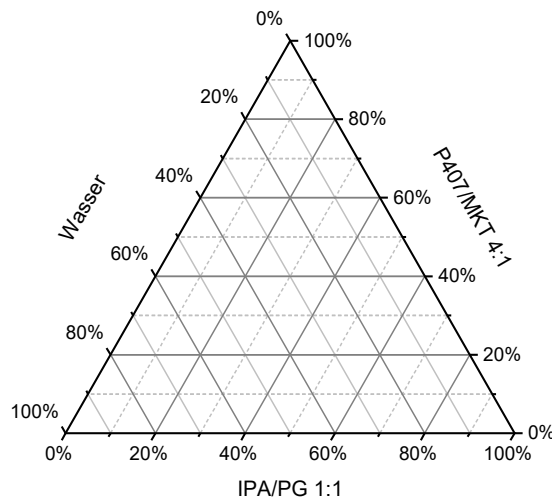


Abbildung 3.1: Pseudoternäres Mischungsdreieck, beispielhafte Verhältnisse P407/MKT 4:1 und IPA/PG 1:1.

Jeder Formulierung wurde eine vierstellige Zahl zugeordnet, wobei die ersten beiden Stellen den prozentualen Anteil an P407 und MKT (in festem Mischungsverhältnis) angeben und die zweiten beiden Stellen den prozentualen Anteil an IPA und PG. So bedeutet die Bezeichnung „3040“ zum Beispiel, dass 30% P407/MKT und 40% IPA/PG enthalten sind, die restlichen 30% sind entsprechend Wasser. Bei wirkstoffhaltigen Formulierungen wurde der prozentuale Anteil des Wirkstoffs und ein Buchstabe zur Kenntlichmachung des Wirkstoffs vorangestellt, in der Formulierung „1S3040“ wurden also in die oben genannte Formulierung 1% SRT eingearbeitet. Variationen der Mischungsverhältnisse wurden durch einen Unterstrich und das variierte Zahlenverhältnis gekennzeichnet. „3040<sub>12</sub>“ bedeutet also, dass das Mischungsverhältnis von IPA/PG von 1:1 nach 1:2 verändert wurde, „3040<sub>32</sub>“ bedeutet, dass das Mischungsverhältnis von P407/MKT von 4:1 nach 3:2 verändert wurde.

### 3.2.2 Herstellung der Formulierungen

Da es in dieser Arbeit primär um flüssige Formulierungen gehen sollte, wurden sie abweichend von den Vorgängerarbeiten nicht mehr im für halbfeste Formulierungen konzipierten Unguator® hergestellt, sondern mit einem Ultra-Turrax® T25 basic Dispergiergerät (IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau) dispergiert. Zur Herstellung wurden zunächst P407 und SRT in ein Glasvial eingewogen und anschließend die flüssigen Bestandteile zugegeben. Der Ansatz wurde mit dem Dispergierwerkzeug S25N-8G des Ultra-Turrax® für 3 Minuten bei 11.000 Umdrehungen pro Minute homogenisiert. Anschließend wurden die Vials mit einem Butylstopfen (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) und einer Aluminiumkappe (VWR International GmbH, Darmstadt) verbördelt. Wenn noch ungelöster Arzneistoff vorhanden war, wurden die Vials für einen Tag bei 37°C mit einer Frequenz von 100/min auf einem Horizontalschüttler geschüttelt.

### 3.2.3 Bestimmung der Sättigungslöslichkeit von SRT in Komponenten und Formulierungen

Zur Bestimmung der Sättigungslöslichkeit in den Formulierungen wurde eine überschüssige Menge SRT (zwischen 3% und 5% m/m) in die zu testende Probe eingearbeitet und der Ansatz für 24 Stunden bei Raumtemperatur mit einem Horizontalschüttler bei einer Frequenz von 100/min durchmischt. Am nächsten Tag wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 14.000rpm zentrifugiert, um das nicht gelöste SRT abzutrennen. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Anschließend wurde er in Acetonitril aufgenommen und wie unter 3.2.6 beschrieben in der HPLC vermessen. Die Sättigungslöslichkeit wurde zunächst in den Einzelkomponenten der Formulierungen bestimmt, um auf den Einfluss der Komponenten auf die Löslichkeit in den Gesamtformulierungen schließen zu können. Außerdem wurde Ethanol absolut (Fisher Scientific, Karlsruhe) als Alternative zu IPA getestet.

Bei der Bestimmung der Sättigungslöslichkeit in den Formulierungen kam es während der Zentrifugation zur Aufräumung der Emulsionstropfen. Sowohl die obere ölige Phase als auch die darunter befindliche wässrige Phase wurden vorsichtig mit einer Pipette entnommen und anschließend durch kräftiges Schütteln homogenisiert. Ein

Teil der so behandelten Probe konnte in Acetonitril gelöst und in der HPLC vermessen werden. Um zu bestimmen, in welcher der beiden Phasen der größere Anteil SRT gelöst war, wurden die beiden Phasen bei einigen Formulierungen getrennt mit einer Pipette entnommen und der Gehalt in der Öl- und in der Wasserphase separat bestimmt.

### **3.2.4 Stabilitätsuntersuchungen wirkstofffreier Formulierungen**

Zu Beginn der Arbeit wurden zunächst wirkstofffreie Formulierungen untersucht, um stabile, flüssige Systeme zu finden, die sich für die Einarbeitung von SRT eigneten. Dafür wurde das Verhältnis der drei Komponenten des Mischungsdreiecks in 10%-Schritten variiert. In Vorversuchen wurde ein Bereich im Mischungsdreieck ausgewählt, in dem sich flüssige Zubereitungen befanden, die nicht unmittelbar nach Herstellung instabil waren. Die resultierenden Formulierungen wurden in 2ml-Vials abgefüllt, mit Butylstopfen und Aluminiumkappen verbördelt und für 24 Wochen bei 30°C eingelagert. Die Lagerungstemperatur wurde dabei nach ICH-Richtlinie Q1A(R2) (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, 2003) ausgewählt. Nach einem Tag sowie nach 1, 2, 4, 10, 16 und 24 Wochen wurde jeweils ein Vial pro Zusammensetzung geöffnet und auf das makroskopische und mikroskopische Erscheinungsbild geprüft.

#### **3.2.4.1 Makroskopische Charakterisierung**

Zur Beurteilung der makroskopischen Eigenschaften wurden die Vials ohne Erschütterungen aus dem Lagerschrank entnommen und es wurde beobachtet, ob eine Phasentrennung zu erkennen war. Lag Phasentrennung vor, wurde zwischen Aufräumung und vollständiger Koaleszenz der Emulsionstropfen unterschieden, wobei makroskopisch erkennbare Tropfen bereits als vollständige Koaleszenz gezählt wurden. Außerdem wurden die Konsistenz bzw. Fluidität beurteilt und in halbfest, zähflüssig und flüssig unterschieden. Als halbfest wurden die Formulierungen bezeichnet, wenn sie beim Kippen des Vials eine Fließgrenze erkennen ließen, als zähflüssig, wenn eine von Wasser unterschiedliche Viskosität deutlich zu erkennen war. Wenn es sich um aufgerahmte Emulsionen handelte, wurde als weiteres Kriterium

betrachtet, wie gut sie sich wieder homogenisieren ließen. Dafür wurde das Vial zunächst zwei bis dreimal umgeschwenkt. Wenn die Emulsion danach wieder ein homogenes Aussehen hatte, wurde dies als „leicht aufschüttelbar“ notiert. Wenn mehr als dreimal umgeschwenkt oder leicht geschüttelt werden musste, wurde dies als „moderat aufschüttelbar“ bezeichnet. Wenn kräftiges Schütteln notwendig war, um Homogenität herzustellen, war die Emulsion „schwer aufschüttelbar“.

Neben diesen Kriterien wurde geprüft, ob Verfärbungen oder andere Veränderungen zu erkennen waren.

### **3.2.4.2 Mikroskopische Charakterisierung**

Für die mikroskopische Charakterisierung wurden die Formulierungen zu jedem Lagerzeitpunkt unter einem Leica DM LM Mikroskop (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) betrachtet. Da es sich bei den meisten untersuchten Systemen um Emulsionen handelte, konnte die Größe der Emulsionstropfen im Verlauf der Lagerung untersucht werden. Dafür wurden Bilder mit einer Olympus DP12 Mikroskopkamera (Olympus, Hamburg) aufgenommen und die Fläche der Emulsionstropfen bestimmt. Dies geschah mit der Software ImageJ, mit der die Fläche jedes einzelnen Emulsionstropfens einer Aufnahme ausgemessen werden konnte. Diese Flächen wurden in Durchmesser umgerechnet, aus denen Median, d10-Wert und d90-Wert berechnet wurden. Der d10-Wert gibt die Partikelgröße an, die 10% der Partikel unterschreiten. Der d90-Wert bedeutet entsprechend, dass 90% der Partikel kleiner sind als dieser Wert. Die minimale Tropfengröße wurde auf 1µm festgesetzt, da es sich bei kleineren Partikeln in der Regel um Artefakte handelte. Die mikroskopische Bestimmung der Tropfengröße hat im Vergleich zu anderen Verfahren wie der Laserlichtbeugung den Nachteil, dass in der Praxis nur eine begrenzte Anzahl an Partikeln betrachtet werden kann. In den hier durchgeführten Messungen wurde eine Mindestanzahl von 1000 Tropfen angestrebt, wofür je nach Abstand und Größe der Tropfen bis zu 20 mikroskopische Aufnahmen kombiniert wurden. Vorteilhaft ist jedoch, dass für die Bestimmung keine Verdünnung der Probe notwendig ist. Da es sich bei der äußeren Phase der Formulierungen um ein nicht nur wässriges Stoffgemisch handelt, würde eine Verdünnung mit Wasser die Tropfengröße auf unvorhersehbare Weise beeinflussen. Bei mikroskopischer Betrachtung kann es

lediglich beim Auflegen des Deckgläschens zu einem Abflachen größerer Tropfen kommen, was den errechneten Durchmesser systematisch erhöhen kann. Dies ist jedoch nur bei Tropfengrößen zu erwarten, die bereits eine Instabilität der Emulsion vermuten lassen.

An zwei Beispielen wurde außerdem getestet, ob die Tropfengröße durch stärkeren Energieeintrag wiederhergestellt werden kann. Dafür wurden die Formulierungen nach 24 Wochen Lagerung 30 Sekunden lang kräftig geschüttelt und anschließend erneut die Tropfengröße bestimmt.

### **3.2.5 Stabilitätsuntersuchungen wirkstoffhaltiger Formulierungen**

Die Stabilitätsuntersuchungen wirkstoffhaltiger Formulierungen wurde in gleicher Weise durchgeführt wie bei wirkstofffreien Formulierungen, dabei wurde auf Veränderungen der makroskopischen und mikroskopischen Eigenschaften durch Einarbeitung von SRT geachtet. Zusätzlich wurde die chemische Stabilität von SRT wie unter 3.2.5.2 beschrieben bestimmt. Bei der mikroskopischen Untersuchung wurde mithilfe der Polarisationsmikroskopie auf das Vorhandensein von auskristallisiertem SRT geprüft.

#### **3.2.5.1 Auswahl der Formulierungen**

Aufgrund der Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen wirkstofffreier Formulierungen wurden Zusammensetzungen ausgewählt, in die SRT eingearbeitet werden sollte. Kriterien dafür waren, dass die Formulierungen flüssig und bei Aufrührung leicht bis moderat aufschüttelbar sein sollten. Formulierungen, die innerhalb der 24 Wochen Lagerzeit vollständige Koaleszenz zeigten, wurden für die weitere Bearbeitung ausgeschlossen. In die verwendeten Formulierungen wurde bis zu 1% SRT eingearbeitet. Lag die nach 3.2.3 bestimmte Sättigungslöslichkeit unter 1%, wurde jeweils eine knapp darunterliegende Menge eingearbeitet. In ausgewählten Experimenten wurden die unter 3.2.1 beschriebenen variierten Mischungsverhältnisse untersucht, dies ist in den jeweiligen Abschnitten in Kapitel 4 vermerkt. Als Vergleich zu einem Marktprodukt wurde Mykosert® Spray verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Sprühformulierung, die zur Behandlung von Pilzinfektionen der Haut mit

Dermatophyten und zur Behandlung von Pityriasis versicolor zugelassen ist (Dr. Pflieger Arzneimittel GmbH, 2015). Mykosert® Spray enthält 2% (m/V) SRT als pharmakologisch aktive Komponente, weitere Bestandteile sind Ethanol 96% (V/V), Glycerinformal und PG. In Versuchen mit Nagelmodellen diente Mykosert® Spray als Negativkontrolle, da eine für den Einsatz für die Haut optimierte Formulierung keine Permeation durch den Nagel erwarten lässt.

### **3.2.5.2 Chemische Stabilität von SRT**

Um chemische Interaktionen zwischen SRT und den Bestandteilen des Vehikels auszuschließen, wurde zu jedem unter 3.2.4 aufgeführten Messzeitpunkt der Gehalt an SRT bestimmt. Dafür wurden nach Homogenisieren der aufgerahmten Proben jeweils etwa 100µl Formulierung in Messkolben eingewogen und zu 10ml in Acetonitril gelöst. Die so erhaltene Lösung wurde wie unter 3.2.6 beschrieben mittels HPLC vermessen.

### **3.2.6 HPLC-Analytik**

Die HPLC-Methode wurde an Manian et al. (2016) angelehnt, dabei wurden einige Parameter zur Verkürzung der Retentionszeit von SRT variiert. Es kam eine HPLC der Firma Waters zum Einsatz, mit der Pumpe 515, dem Controller 600, dem UV-Detektor 486 und dem Autosampler 717plus. Die verwendete Säule war eine Agilent Zorbax SB-C18 5µm 4,6 x 250mm. Das Fließmittel war ein Gemisch aus Acetonitril und einem 10mM Phosphatpuffer pH 3 im Volumenverhältnis 80:20. Die Flussrate betrug 1,5ml/min, die Detektionswellenlänge 225nm und das Einspritzvolumen 20µl. Die Retentionszeit von SRT lag unter diesen Bedingungen bei etwa 4,5 Minuten. Die Kalibrierung erfolgte im Bereich zwischen 0,2µg/ml und 200µg/ml. Nach ICH Guideline Q2(R1) ergab sich eine Nachweisgrenze von 0,5ng/ml und eine Bestimmungsgrenze von 1,4ng/ml.

### 3.2.7 Gewinnung von SC

Für die Gewinnung von SC wurden Hautspenden aus Bauchdeckenplastiken verwendet, die von Dr. Hasse (Facharzt für Ästhetische und Plastische Chirurgie, Chirurgie und Visceralchirurgie, Braunschweig) erhalten wurden. Es wurden ausschließlich gesunde Hautareale von weiblichen Spendern verwendet. Weibliche Spender werden generell bevorzugt, da möglichst wenig behaarte Haut notwendig ist, um den Einfluss von Löchern im SC durch Haarfollikel gering zu halten. Die Hautstücke wurden direkt nach Entnahme mit Skalpellen vom Unterhautfettgewebe befreit und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -22°C gelagert. Vor Durchführung einer Versuchsreihe wurde das SC präpariert. Dafür wurde ein Hautstück entnommen und eine Stunde lang auftauen gelassen. Das aufgetaute Hautstück wurde mit der Dermisseite auf ein Stück Zellstoff gelegt, dass mit einer Trypsin-Lösung (40mg/100ml) getränkt war. Hierbei kommt es zum enzymatischen Verdau der Dermis, wodurch sich das SC ablöst. Nach 48 Stunden Inkubation bei 37°C konnte es vorsichtig mit einer Pinzette von der Dermis abgezogen werden. Das SC wurde in einer wässrigen Trypsin-Inhibitor-Lösung (100mg/100ml) und anschließend dreimal in bidestilliertem Wasser gewaschen, um einen weiteren enzymatischen Verdau zu verhindern. Es folgte die Trocknung auf einem Teflonsieb im Exsikkator. Das so gewonnene SC wurde im Exsikkator aufbewahrt und für maximal zwei Monate verwendet. Für die Versuche wurden jeweils runde Stücke mit einem Durchmesser von 1,5cm ausgestanzt.

### 3.2.8 Herstellung von Keratinfilmen (KF)

Für die Herstellung der KF nach Lusiana et al. (2011) wurden Haarspenden von Friseursalons in Braunschweig und Göttingen sowie von Einzelpersonen am Institut verwendet. Die Haare sollten möglichst hellblond oder weiß sein, da das Haarpigment die Bildung der KF stören kann (Lusiana et al., 2011). Außerdem wurden gebleichte, gefärbte oder auf sonstige Weise vorbehandelte Haare von den Versuchen ausgeschlossen. Zur Extraktion des Keratins wurde die Shindai-Methode (Nakamura et al., 2002) in leicht abgewandelter Form verwendet:

20g Haare wurden mit einer wässrigen Lösung von 0,5% Natriumlaurylsulfat gewaschen und in ca. 1cm lange Stücke geschnitten. Anschließend wurden sie mit

400ml Shindai-Lösung versetzt, wobei es sich um eine wässrige Lösung von 25mmol/l TRIS pH8,5, 2,6mol/l Thioharnstoff, 5mol/l Harnstoff und 5% (V/V) 2-Mercaptoethanol handelt. Der Ansatz wurde für 72 Stunden bei 50°C gerührt. Nach 72 Stunden folgte ein Filtrierschritt durch vier Lagen Verbandmull und anschließende Zentrifugation für 2 x 30 Minuten bei 5000rpm. Der Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe durch Filterpapier filtriert (Porengröße 2,5µm) und konnte anschließend eingefroren und aufbewahrt werden.

Zur Herstellung der KF wurde das Filtrat aufgetaut, in einen Dialyseschlauch gegeben (MWCO 6000-8000 Da) und für 72 Stunden bei Raumtemperatur gegen Wasser dialysiert. Es folgten mindestens drei Zentrifugationen für 30 Minuten bei 10.000 Umdrehungen pro Minute, um größere Aggregate zu entfernen. Anschließend wurde 1% (m/m) Glycerol als Weichmacher zugegeben, da die resultierenden Filme sonst zu spröde würden. Als Form für die KF wurden in unserer Werkstatt gefertigte Teflonringe verwendet, die mit Silikonpaste auf einer PET-Folie fixiert und von unten mit einer Metallplatte stabilisiert waren. Das Dialysat wurde in die Teflonringe pipettiert und bei 40°C für mindestens 24 Stunden trocknen gelassen. Die Dicke der KF ließ sich über die Menge des Dialysats bestimmen. Für jede Dialysat-Charge wurde dafür zunächst ein Bradford-Test mit bovinem Serumalbumin als Standard durchgeführt, um den Gehalt an Keratin abzuschätzen. In Abhängigkeit des Gehalts wurden 2-2,5ml Dialysat verwendet, um die gewünschte Dicke zu erreichen. Diese wurden in zwei gleich großen Anteilen im Abstand von sechs Stunden zugegeben, um die Bildung von Luftblasen während der Trocknung zu minimieren. Die Dicke der resultierenden KF betrug zwischen 100µm und 150µm. Nach vollständiger Trocknung wurden die Filme 3 Stunden lang bei 110°C verbacken. Mithilfe einer Mikrometerschraube konnte die Dicke bestimmt werden, für die Experimente wurden jeweils KF einheitlicher Dicke verwendet.

### **3.2.9 Herstellung von bovinen Hufscheiben (BH)**

Zur Herstellung der Hufscheiben wurden 2cm x 2cm große Stücke aus der Sohle von Rinderhufen ausgeschnitten (Rinderhufe bezogen von Intercon Tierbedarf GmbH, Henstedt-Ulzburg). Diese Stücke wurden in bidestilliertes Wasser eingelegt und 24 Stunden quellen gelassen. Nach 24 Stunden waren die Hufstücke weich genug, um



sie mit einem Rotationsmikrotom (MICROM HM 355S, Walldorf) zu schneiden. Scheiben mit einer Dicke von 100µm oder 120µm wurden geschnitten und trocknen gelassen. Vor Verwendung wurde die Dicke in gequollenem Zustand mit einer Mikrometerschraube überprüft. Die Hufstücke wurden bis zu zweimal erneut in bidestilliertes Wasser eingelegt, um nach weiteren 24 Stunden weitere Schnitte durchzuführen.

### **3.2.10 Permeationsuntersuchungen**

#### **3.2.10.1 Versuchsaufbau**

Zur Bestimmung der permeierten Wirkstoffmenge aus unterschiedlichen Formulierungen wurden Permeationsuntersuchungen in modifizierten Franzzellen durchgeführt (Abbildung 3.2). Dabei wurde das Donor-Kompartiment bis knapp unter den oberen Rand mit der zu testenden Formulierung gefüllt. Es handelt sich um ein infinite-dose-Experiment, da die zu testende Formulierung so im Überschuss vorliegt und sich die Wirkstoffkonzentration im Verlauf des Versuches praktisch nicht verändert. Das Akzeptor-Kompartiment wurde mit Akzeptormedium gefüllt. Anforderungen an das Akzeptormedium sind eine möglichst geringe Beeinflussung der Barriere sowie eine ausreichende Löslichkeit für den Arzneistoff, um sink-Bedingungen zu erreichen. Als Barriere kamen SC, KF und BH zum Einsatz. Das Volumen der verwendeten Akzeptor-Kompartimente lag zwischen 4,5ml und 7,0ml, die für die Permeation zur Verfügung stehende Fläche zwischen 0,39cm<sup>2</sup> und 0,57cm<sup>2</sup>.

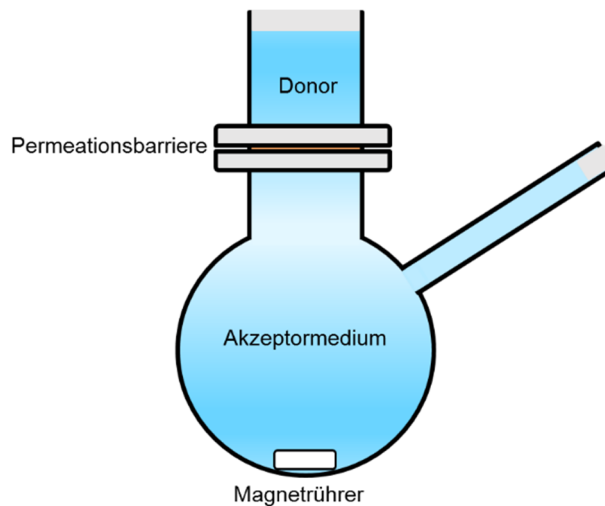


Abbildung 3.2: Modifizierte Franzzelle.

Vor den ersten Versuchsdurchführungen wurde zunächst ein Akzeptormedium gesucht, das die oben genannten Kriterien erfüllte. Dabei wurde von PBS als Medium ausgegangen, da dieser physiologischen Bedingungen nahekommt. Aufgrund der geringen Löslichkeit von SRT wurden PG und IPA zugesetzt, um eine Löslichkeitsverbesserung zu erzielen. Diese Stoffe wurden ausgewählt, da sie auch in den untersuchten Formulierungen enthalten waren und die Barriere somit von beiden Seiten in gleicher Weise beeinflusst wird. Bei Verwendung eines zusätzlichen Emulgators im Akzeptormedium wäre dies nicht gegeben. Die zugegebene Menge IPA und PG wurde in 10%-Schritten variiert und die Sättigungslöslichkeit von SRT wie unter 3.2.3 beschrieben bestimmt. Aufgrund der Ergebnisse (siehe Abschnitt 4.2.1) wurde für alle Experimente eine Mischung aus 60% PBS, 20% IPA und 20% PG (jeweils V/V) als Akzeptormedium festgesetzt.

In späteren Untersuchungen stellte sich heraus, dass die so bestimmte Sättigungslöslichkeit des Akzeptormediums zu hoch war, da zu vermuten ist, dass durch teilweise Auflösung des SRT Nanokristalle entstanden, die bei der Probenvorbereitung weder abzentrifugiert noch abfiltriert werden konnten. Dadurch wurde fälschlicherweise eine zu hohe Sättigungslöslichkeit bestimmt. Um die Einhaltung der sink-Bedingungen zu überprüfen, wurde die Sättigungslöslichkeit deshalb erneut mit einer anderen Methode bestimmt: Eine Konzentrationsreihe wurde angesetzt, bei der die SRT-Konzentration zunächst in 50µg/ml-Schritten und später in 25µg/ml-Schritten variiert wurde. Die Proben wurden jeweils für 3 Tage bei 37°C auf

einem Horizontalschüttler mit einer Frequenz von 100/min durchmischt und es wurde vor einer hellen Lampe beobachtet, ob ungelöste SRT-Kristalle vorhanden waren.

Zur Auswertung der Permeationsdaten wurde die permeierte Wirkstoffmenge pro Permeationsfläche gegen die Zeit aufgetragen. Bei einem infinite-dose-Experiment unter Einhaltung der sink-Bedingungen ergibt sich nach einer eventuellen lag-Phase ein linearer Zusammenhang. Diesem liegt das Fick'sche Diffusionsgesetz zugrunde (Gleichung 3.1). Die Steigung des Graphen entspricht dabei dem Arzneistoffflux  $J$  (Gleichung 3.2). Aus diesem kann unter Berücksichtigung der Wirkstoffkonzentration im Donor der Permeationskoeffizient  $P$  berechnet werden (Gleichung 3.3).

$$\frac{dM}{dt} = \frac{D_B \cdot K \cdot A \cdot c_D}{h} \quad \text{Gleichung 3.1}$$

$$J = \frac{dM}{dt \cdot A} = \frac{D_B \cdot K \cdot c_D}{h} \quad \text{Gleichung 3.2}$$

$$P = \frac{D_B \cdot K}{h} = \frac{J}{c_D} \quad \text{Gleichung 3.3}$$

$M$  = permeierte Wirkstoffmenge [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]

$t$  = Zeit [s]

$D_B$  = Diffusionskoeffizient in der Barriere [ $\text{cm}^2/\text{s}$ ]

$K$  = Verteilungskoeffizient Barriere / Donor

$A$  = Permeationsfläche [ $\text{cm}^2$ ]

$c_D$  = Wirkstoffkonzentration im Donor [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ]

$h$  = Diffusionsweg durch die Barriere [cm]

$J$  = Arzneistoffflux [ $\text{g}/\text{cm}^2\text{s}$ ]

$P$  = Permeationskoeffizient [ $\text{cm}/\text{s}$ ]

In den Versuchen mit KF wurde die Steigung im Bereich zwischen Stunde 4 und Stunde 30 bestimmt, da die lag-Phase nach 4 Stunden abgeschlossen war. In

Versuchen mit SC wurde die Steigung ebenfalls zwischen Stunde 4 und Stunde 30 bestimmt. Hier war allerdings nach Versuchsbeginn eine Reduktion des Arzneistofffluxes im Laufe der Zeit zu beobachten. In einigen Fällen nahm der Flux auch nach Stunde 4 noch leicht ab, sodass die bestimmte Steigung hier mit einer Unsicherheit behaftet ist (leicht höhere Steigung zu Beginn, leicht niedrigere Steigung gegen Ende, siehe auch Abschnitt 4.2.2). Ein Versuch musste nach 24 Stunden abgebrochen werden, dort erfolgte Bestimmung zwischen Stunde 4 und Stunde 24.

### **3.2.10.2 Permeationsuntersuchungen durch SC**

Bei den Permeationsuntersuchungen durch SC kam jeweils Haut von nur einer Spenderin zum Einsatz, um unterschiedliche Formulierungen miteinander zu vergleichen. Dies hat den Grund, dass interindividuelle Schwankungen bei SC deutlich bemerkbar sind und die Vergleichbarkeit bei unterschiedlichen Spendern somit nicht gegeben ist (Southwell et al., 1984). Das SC wurde vor Verwendung bis zu zwei Monate im Exsikkator gelagert, nach Auftreten von größeren Schwankungen (siehe Abschnitt 4.2.2) wurde die Haltbarkeit vorsichtshalber auf einen Monat begrenzt. Die Stücke mit 1,5cm Durchmesser wurden vor Versuchsbeginn über einer gesättigten wässrigen Natriumchlorid-Lösung hydriert, um einen immer einheitlichen Hydratationsgrad beim Start der Permeation zu erreichen. Zur mechanischen Unterstützung wurden die Stücke auf einen Polycarbonat-Membranfilter (Isopore®, Porengröße 5µm, Durchmesser 1,5cm) gelegt und anschließend mit Silikonpaste zwischen Donor- und Akzeptor-Kompartiment fixiert. Zur Vermeidung von Verdunstung wurden alle Öffnungen der Franzzellen mit Parafilm® abgedichtet. Die Zellen wurden in ein auf 32°C Oberflächentemperatur temperiertes Wasserbad gestellt und mit 240 Umdrehungen pro Minute gerührt. Proben von 250µl wurden in regelmäßigen Zeitabständen gezogen und das entnommene Volumen sofort mit frischem, temperiertem Akzeptormedium ersetzt. Die Probenzugzeiten variierten leicht je nach Versuchsserie. Die Versuchsdauer betrug zwischen 28 und 32 Stunden, die Abstände der Proben lagen zu Beginn bei ein bis zwei Stunden und gegen Ende bei drei bis vier Stunden. Die Nachtpause betrug zwischen acht und elf Stunden. Die Proben wurden sofort oder spätestens am nächsten Morgen wie unter 3.2.6 beschrieben mittels HPLC vermessen.

Aufgrund aufgetretener Schwankungen innerhalb einer Hautspende wurde in späteren Versuchen vor Versuchsbeginn der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER-Wert, Transepithelial Electrical Resistance) bestimmt. Dieser dient als Maß für die Intaktheit des SC. Ein niedriger TEER-Wert weist auf Löcher oder andere Schäden in der Membran hin. Für die Messung wurde ein „EVOM2™ Epithelial Voltohmmeter“ (World Precision Instruments Germany GmbH, Friedberg) und ein für die Benutzung in der Franzzelle konstruiertes Elektrodenpaar verwendet. Nach Einsetzen der SC-Stücke in die Franzzellen wurden dafür Akzeptor- und Donor-Kompartiment mit PBS gefüllt und je eine Elektrode in jedes Kompartiment eingebracht. Nach Ablesen des TEER-Wertes wurde der PBS verworfen und die Franzzelle mit Akzeptormedium und zu testender Formulierung befüllt. Als Grenzwert für die Intaktheit des SC wurde ein TEER-Wert von 100k $\Omega$  festgelegt. Dies entspricht gleichzeitig der Obergrenze des Messbereichs (Anzeigebereich bis 120k $\Omega$ ), sodass der tatsächliche TEER-Wert bei einer Anzeige über 100k $\Omega$  nicht bestimmt werden kann. Es wird davon ausgegangen, dass ein TEER-Wert unter 100k $\Omega$  bereits auf mechanische Schäden des SC hinweisen kann. Die betreffenden Franzzellen wurden entsprechend aussortiert.

Als Zusatzversuch zur Variabilität der Ergebnisse wurden in einer Versuchsdurchführung alle SC-Stücke vor Versuchsbeginn gewogen, um auf mögliche Unterschiede in der Dicke schließen zu können, die die Permeabilität beeinflussen könnten. Außerdem wurde der TEER-Wert nicht nur vor Beginn der Permeation gemessen, sondern auch danach, um die Veränderung während der Permeation zu beobachten. Hierfür wurden Donor- und Akzeptor-Kompartiment der Franzzelle entleert, je dreimal mit PBS gespült und anschließend für die Messung mit frischem PBS gefüllt.

### **3.2.10.3 Permeationsuntersuchungen durch Nagelmodelle**

Die Durchführung der Permeationsuntersuchungen durch KF und BH erfolgte analog zum unter 3.2.10.2 beschriebenen Vorgehen bei SC. Deshalb soll hier nur auf die Abweichungen von der Durchführung unter 3.2.10.2 eingegangen werden. Die Nagelmodelle wurden vor Versuchsbeginn nicht über einer Natriumchlorid-Lösung hydratisiert, sondern eine Stunde lang in PBS quellen gelassen. Da die mechanische Stabilität durch die Nagelmodelle selbst gegeben war, wurde kein unterstützender

Filter verwendet. Außerdem konnte die Bestimmung des TEER-Wertes hier entfallen, da die Nagelmodelle gleichmäßiger beschaffen waren als das SC und mechanische Beeinträchtigungen leicht zu erkennen waren. Es wurden jeweils KF und BH mit einheitlicher Dicke verwendet.

#### **3.2.10.4 Extraktion des Wirkstoffs aus SC und Nagelmodellen nach Ende der Permeationsuntersuchung**

Unmittelbar nach Beendigung des Permeationsexperiments wurden SC bzw. Nagelmodelle aus den Franzzellen entnommen, mit einem Filterpapier vorsichtig von Resten der Formulierungen befreit und mit 500µl Methanol versetzt, um den verbliebenen Wirkstoff zu extrahieren. Nach 24 Stunden wurde mit weiteren 500µl Methanol gespült. Anschließend wurden die vereinigten Lösungen zur Trockne eingedampft, der Rückstand in Acetonitril gelöst und mittels HPLC vermessen. Um bei den Versuchen mit SC auszuschließen, dass Wirkstoff an die unterstützende Membran adsorbiert, wurden drei der verwendeten Membranen identisch behandelt.

#### **3.2.11 Extraktion von Nagelmodellen und menschlichen Nagelschnipseln (NS) nach Inkubation mit SRT**

Um zu untersuchen, inwiefern die Extraktion der Nagelmodelle Rückschlüsse auf den Wirkstoffgehalt in menschlichen Nägeln schließen lässt, wurde ein Experiment mit menschlichen Nagelschnipseln (NS) durchgeführt. Die NS wurden von Mitarbeitern des Instituts gewonnen und vor Versuchsbeginn mit Wasser gereinigt. Die Versuchsbedingungen orientierten sich an denen der Permeationsuntersuchungen: NS, KF und BH wurden eine Stunde lang in PBS quellen gelassen, anschließend wurden sie gewogen und in eine der P407-basierten Formulierungen eingelegt. Nach 30 Stunden erfolgte die methanolische Extraktion wie unter 3.2.10.4 beschrieben. Der Gehalt an SRT wurde mittels HPLC bestimmt und auf die Masse bzw. auf die Fläche der NS, KF und BH bezogen. Zur Abschätzung der Oberfläche der NS wurden mikroskopische Bilder von 5 NS aufgenommen und mithilfe der Software ImageJ die Fläche ausgemessen. Diese Fläche wurde zur Berücksichtigung von Ober- und Unterseite verdoppelt, die Seitenflächen wurden aufgrund der geringen Dicke

vernachlässigt. Diese abgeschätzte Oberfläche wurde auf die Masse bezogen. Mithilfe des so aufgestellten Verhältnisses wurde die abgeschätzte Oberfläche aller weiteren NS über deren Masse berechnet.

### 3.2.12 Infiziertes Nagelmodell

Ein infiziertes Nagelmodell nach Lusiana et al. (2013) wurde verwendet, um die Hemmung des Pilzwachstums zu evaluieren. Dafür wurde zunächst eine Kultur von *Trichophyton rubrum* (Stammkultur 19959, bezogen von Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Braunschweig) zur Aktivierung unter Laminar Air Flow auf Aktivkohle-Agar ausgestrichen und 7 Tage lang bei 30°C inkubiert. Der Aktivkohle-Agar wurde aus 3% (m/m) Malzextrakt (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim), 0,3% Aktivkohle (Caesar & Loretz GmbH, Hilden), 1,65% Agar-Agar (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) und destilliertem Wasser hergestellt. Zur Infektion wurde die Kultur von *Trichophyton rubrum* auf Kartoffel-Glucose-Agar (Mischung bezogen von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim; Zusammensetzung des fertigen Mediums 4g/l Kartoffelstärke, 20g/l Dextrose und 15g/l Agar-Agar) ausgestrichen und maximal fünf der zuvor sterilisierten Nagelmodelle wurden auf einer Agarplatte platziert. Die Sterilisation der Nagelmodelle erfolgte mittels Autoklavierung bei 121°C und 2bar für 15 Minuten in PBS (BH) bzw. in einer Mischung aus 5% PBS und 95% Wasser (m/m) (KF). Bei den KF wurde diese Mischung verwendet, da in reinem PBS die mechanische Stabilität deutlich abnahm und die KF nicht stabil genug waren, um sie auf den Agar zu übertragen. Ein gewisser Anteil war jedoch nötig, um eine raue Oberfläche zu erzeugen und so die Infektion mit *T. rubrum* zu ermöglichen. In Vorversuchen erwies sich ein Anteil von 5% als guter Kompromiss zwischen Stabilität und Anrauhung der Oberfläche. Nach 7 Tagen Inkubation der Nagelmodelle bei 30°C wurden sie unter Laminar Air Flow vorsichtig mit einer Pinzette vom Agar genommen und von Agar-Resten befreit. Anschließend wurden sie einzeln auf Sabouraud-Dextrose-Agar (bestehend aus 2,86% Sabouraud-Dextrose-Brühe (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim), 1,9% Agar-Agar (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) und destilliertem Wasser) überführt (ein Nagelmodell je Agarplatte). Ein Polyamid-Ring (Außendurchmesser 12,5mm, Höhe 5mm, Dicke 3mm) wurde mit Silikonpaste auf dem Nagelmodell fixiert und 0,2ml der zu testenden Formulierung mit

einer sterilen Einmalspritze in die Mitte des Rings gegeben. Der Ring wurde mit einer PET-Folie abgedeckt, um eine Verdunstung der Formulierung zu vermeiden. Nach weiteren 6 Tagen Inkubation wurde das Pilzwachstum am Rand des Nagelmodells bzw. auf dem Agar beobachtet und ein Score von 0 bis 10 vergeben. Dabei bedeutet ein Score von 0, dass kein Pilzwachstum vorhanden ist, ein Score von 10 bedeutet vollständige Besetzung des Randes mit Pilzkolonien. Werte zwischen 0 und 10 sind als Prozentwerte zu verstehen, z.B. bedeutet ein Score von 3, dass an 30% des Nagelrandes Pilzwachstum zu sehen war. Waren auf dem Agar außerhalb der Nagelmodelle Pilzkolonien zu erkennen, wurde dafür ein Score von 0,5 vergeben. Als Blindprobe wurde ein nicht mit einer Formulierung behandeltes, infiziertes Nagelmodell verwendet, das vollständiges Pilzwachstum zeigen musste. Als Positivkontrolle für eine Pilzabtötung dienten entweder das kommerzielle Produkt Ciclopoli® oder eine Ciclopirox-olamin-haltige Formulierung, die in früheren Arbeiten im infizierten Nagelmodell vollständige Wachstumshemmung zeigte (Täuber und Müller-Goymann, 2016). Außerdem wurden wirkstofffreie Formulierungen untersucht, um die Hemmung des Pilzwachstums durch die Einzelkomponenten auszuschließen.

### **3.2.13 Infiziertes SC-Modell**

Analog zum infizierten Nagelmodell wurden Versuche mit SC durchgeführt, um die Hemmung des Pilzwachstums nach Behandlung mit den untersuchten Formulierungen zu evaluieren. Die Versuchsdurchführung war dabei weitestgehend identisch zum unter 3.2.12 beschriebenen Vorgehen für Nagelmodelle. Anders als dort wurde bei SC jedoch ein Polycarbonat-Filter zur mechanischen Stabilisierung verwendet, um die SC-Stücke ohne Beschädigung transferieren zu können. Der Polycarbonat-Filter wurde im ersten Schritt unter den SC-Stücken platziert. Da das SC durch Autoklavierung zerstört würde, wurde es außerdem vor dem Versuch nicht sterilisiert. Stattdessen wurde es mit sterilisiertem Wasser gespült, um die Keimbelastung möglichst gering zu halten. Trotzdem kam es gelegentlich während der Inkubation zum Befall mit Fremdkeimen, die betreffenden Petrischalen wurden nicht weiter verwendet.

### **3.2.14 Rheologische Untersuchungen**



### 3.2.14.1 Fließkurven

Zur Bestimmung der rheologischen Eigenschaften wurde ein HAAKE Rheostress 6000 Rheometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) im Rotationsmodus verwendet. Die Fließkurven wurden mit einer Kegel-Platte-Geometrie mit einem Durchmesser von 60mm und einem Winkel von 1° aufgenommen. Die maximal angelegte Schubspannung betrug je nach Viskosität der Probe zwischen 20 und 150 Pascal, es wurde jeweils Hin- und Rückweg gemessen. Alle Proben wurden bei 4°C, 20°C und 32°C vermessen, um ein mögliches Thermogelieverhalten zu beobachten. Dabei wurde zur Vermeidung von Verdunstung der flüchtigen Bestandteile eine Lösemittelfalle verwendet. Bei idealviskosen Systemen wurde aus der Steigung des Rheogramms die dynamische Viskosität berechnet (Gleichung 3.4). Wenn eine Fließgrenze vorhanden war, wurde die dynamische Viskosität anhand der Steigung der Rück-Kurve abgeschätzt.

$$\eta = \tau \cdot \dot{\gamma} \quad \text{Gleichung 3.4}$$

$\eta$  = dynamische Viskosität [Pa·s]

$\tau$  = Schubspannung [Pa]

$\dot{\gamma}$  = Schergefälle [1/s]

### 3.2.14.2 Oszillationsrheologische Untersuchungen

Mit den oszillationsrheologischen Messungen sollte eine mögliche Thermogelierung der P407-basierten Formulierungen untersucht werden. Dabei wurden das Speichermodul  $G'$  (Gleichung 3.5) als Maß für die elastischen Anteile der Probe und das Verlustmodul  $G''$  (Gleichung 3.6) als Maß für die viskosen Anteile betrachtet. Im flüssigen Zustand sind die viskosen Anteile der Probe größer ( $G'' > G'$ ), im halbfesten Zustand überwiegen die elastischen Anteile ( $G' > G''$ ). Als Thermogelierungspunkt (TGP) ist die Temperatur zu bestimmen, bei der  $G'$  und  $G''$  gleich sind (Ross-Murphy, 1995). Bei  $\delta$  handelt es sich um den Phasenverschiebungswinkel zwischen Schubspannung und Deformation. Der Phasenverschiebungswinkel beträgt 0° bei idealelastischem Verhalten und 90° bei idealviskosem Verhalten. Am TGP nimmt er einen Wert von 45°

an, somit kann der TGP auch am Phasenverschiebungswinkel abgelesen werden (Gleichung 3.7).

$$G' = G^* \cdot \cos \delta \quad \text{Gleichung 3.5}$$

$$G'' = G^* \cdot \sin \delta \quad \text{Gleichung 3.6}$$

$$\tan \delta = G'' / G' \quad \text{Gleichung 3.7}$$

$G'$  = Speichermodul

$G''$  = Verlustmodul

$G^*$  = Komplexer Schubmodul

$\delta$  = Phasenverschiebungswinkel

Alle Messungen fanden im linear viskoelastischen Bereich (LVEB) statt, der vor der Messung des TGP bestimmt wurde. Dafür wurden ein Amplitudensweep und ein Frequenzsweep durchgeführt, um den Amplituden- und Frequenzbereich zu bestimmen, in dem  $G'$  und  $G''$  konstant sind. Da bei diesen Messungen Temperaturen bis zu 60°C erreicht wurden und die Lösemittelfalle eine Verdunstung flüchtiger Bestandteile nicht ganz ausschließen konnte, kam bei den oszillationsrheologischen Untersuchungen eine Doppelkegel-Geometrie mit einem Durchmesser von 60mm und einem Winkel des Doppelkegels von 2° zum Einsatz. Diese hatte den Vorteil, dass der Spalt seitlich abgedeckt war und nur an der Achse des Doppelkegels eine kleine Fläche zur Verdunstung zur Verfügung stand. Das zusätzlich größere Probenvolumen von 5,4ml statt 1ml sorgte außerdem dafür, dass eine geringe Verdunstung flüchtiger Bestandteile weniger ins Gewicht fiel.

Zur Verifizierung einer möglichen Thermogelierung wurden alle ausgewählten Formulierungen in einem geschlossenen Vial im Wasserbad auf etwa 60°C erwärmt und makroskopisch das Vorhandensein einer Fließgrenze beurteilt.

### 3.2.15 DSC-Untersuchungen

#### 3.2.15.1 DSC-Untersuchungen an SC

Um die Interaktion von permeationsfördernden Bestandteilen der Formulierungen mit dem SC zu untersuchen, wurden DSC-Messungen durchgeführt. Dafür wurde ein Stück SC (Durchmesser 1,5cm) für 30 Minuten bei 32°C in die zu untersuchende Formulierung gegeben. Anschließend wurde das Stück vorsichtig mit einem Zellstofftuch von Formulierungsresten befreit, in einen Aluminiumtiegel für die DSC (Mettler-Toledo International Inc., Columbus, Vereinigte Staaten) eingewogen und bei einer Heizrate von 5K/min vermessen. Als Referenz diente ein leerer Aluminiumtiegel. Um durch die Formulierung selbst verursachte endotherme Übergänge auszuschließen, wurde jeweils die reine Formulierung bei gleichen Bedingungen gemessen.

Beim Erhitzen von SC zwischen 20°C und 120°C kommt es zu vier endothermen Übergängen (T1-T4), erkennbar durch Negativpeaks im Wärmestrom. Durch eine Änderung in der Fluidität der SC-Lipide kommt es zu einer Verschiebung der Temperatur, bei der diese Übergänge auftreten. Somit kann über die Verschiebung der endothermen Übergänge und deren Ausmaß auf eine Beeinflussung der SC-Lipide durch die Formulierungsbestandteile geschlossen werden (Täuber und Müller-Goymann, 2015a). Dabei wurden in Übereinstimmung mit der Literatur die Übergänge T2 und T3 berücksichtigt, da diese reproduzierbare Werte liefern. T1 kann nicht immer beobachtet werden, die Lage von T4 hängt stark vom Wassergehalt des SC ab (Barry, 1987). Alle SC-Stücke, behandelt und unbehandelt, wurden vor Versuchsbeginn 48 Stunden lang über einer gesättigten wässrigen NaCl-Lösung hydratisiert. Dies war notwendig, da auch Wasser einen Einfluss auf die Fluidität der SC-Lipide hat (Barry, 1987) und es zu einer Verschiebung von T2 und T3 um etwa 1,5°C bis 3,5°C kommt (Täuber und Müller-Goymann, 2015a).

### **3.2.15.2 DSC-Untersuchungen an Nagelmodellen und NS**

Bei den DSC-Untersuchungen mit KF und BH sollte untersucht werden, ob Hinweise auf eine Veränderung der Keratinstruktur durch Einwirkung der Formulierungen zu beobachten war. Hierfür wurden die Nagelmodelle für 24 Stunden in bidestilliertem Wasser bzw. in den zu testenden Formulierungen inkubiert. Anschließend wurden sie in Aluminiumtiegeln bei einer Heizrate von 10K/min von 40°C auf 260°C erhitzt. Oberhalb von 200°C denaturiert das Keratin, was durch Negativpeaks im Wärmestrom

zu erkennen war. In einer Veröffentlichung von Thatai und Sapra (2017) wurde mithilfe dieser Denaturierungstemperatur der Einfluss der Penetrationsverbesserer Harnstoff und N-Acetylcystein auf die Keratinstruktur von Rinderhufen untersucht. Dabei stellten sie fest, dass die Denaturierungstemperatur (etwa 220°C) nach 24-stündiger Behandlung mit einer wässrigen 5%-igen Lösung von Harnstoff, N-Acetylcystein oder einer Kombination von beiden um etwa 25-35°C sank. Dies wurde mit der Dichte der Quervernetzungen in der Keratin-Matrix in Verbindung gebracht (Wortmann et al., 2002). Die Ergebnisse von Thatai und Sapra sollten zunächst reproduziert werden und anschließend die P407-basierten Formulierungen auf gleiche Weise untersucht werden.

Als Zusatzversuch wurden NS mit bidestilliertem Wasser, 5%-iger Harnstofflösung und einer P407-basierten Formulierung behandelt. Die Denaturierungstemperatur des Keratins in den NS wurde auf gleiche Weise beobachtet.

### **3.2.16 Statistische Auswertung der Daten**

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit der Software IBM SPSS Statistics (Version 25) durchgeführt. Dabei wurde ein Shapiro-Wilk-Test als Test auf Normalverteilung bei kleinen Stichproben verwendet und ein F-Test zur Überprüfung der Varianzhomogenität. Wenn Varianzheterogenität vorlag, wurde mit einer Welch-ANOVA auf signifikante Unterschiede der Mittelwerte mehrerer Gruppen geprüft und ein Games-Howell-Test als post-hoc-Test durchgeführt, um herauszufinden, zwischen welchen Gruppen Signifikanz vorlag. Beim Vergleich zweier Gruppen wurde ein t-Test durchgeführt. Da die Ergebnisse des infizierten Nagel- bzw. Hautmodells nicht normalverteilt waren und die vergebenen Scores ordinal skaliert sind, wurde dort ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt und der mittlere Rang für jede Formulierung bestimmt. Das Signifikanzniveau wurde für alle Tests auf 0,05 festgelegt.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Charakterisierung Poloxamer 407-basierter Formulierungen

#### 4.1.1 Zusammensetzung und makroskopische Charakterisierung

Zu Beginn der Untersuchungen wurde zunächst ein Bereich im Mischungsdreieck ausgewählt, in dem anhand der Vorarbeiten von Täuber und Müller-Goymann (2015a) flüssige Formulierungen zu erwarten waren. Dabei wurden binäre Mischungen ausgeschlossen. Ebenso wurde der Anteil IPA/PG auf maximal 70% begrenzt, da bei noch höheren Konzentrationen mit großer Wahrscheinlichkeit keine gute Hautverträglichkeit mehr gegeben wäre. Die Anteile der drei Seiten des Mischungsdreiecks wurden in 10%-Schritten variiert und die entsprechenden Formulierungen hergestellt. Im Anschluss an die Herstellung wurden die Formulierungen auf ihre makroskopischen Eigenschaften nach 3.2.4.1 untersucht. So sollte eingegrenzt werden, welche Zusammensetzungen für die weitere Arbeit interessant waren. Es zeigte sich, dass die Grenze zum halbfesten Bereich bei IPA/PG-Anteilen zwischen 20% und 30% lag (Abbildung 4.1). Bei höheren Anteilen IPA/PG verringerte sich die Konsistenz und es ergaben sich flüssige Emulsionen. Einen Tag nach der Herstellung kam es bei allen diesen Emulsionen zur Aufräumung. Durch Schütteln ließen sich die beiden gebildeten Phasen wieder homogenisieren.

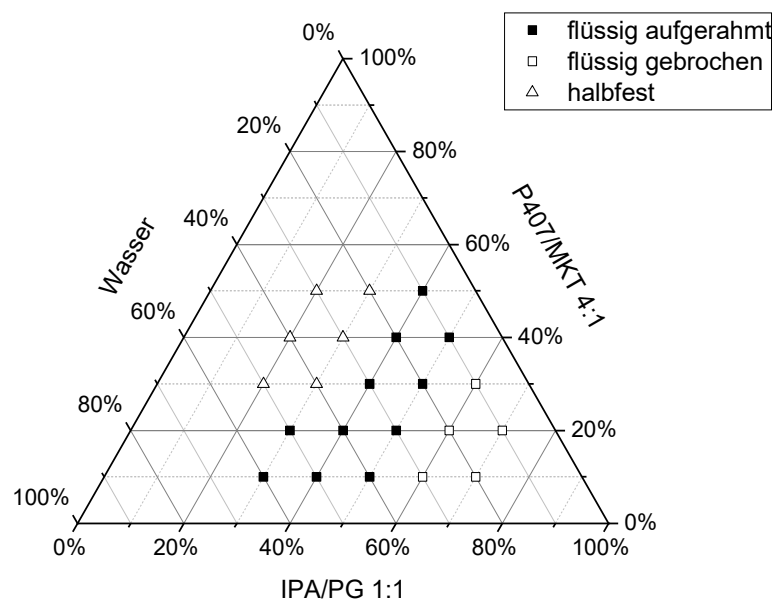
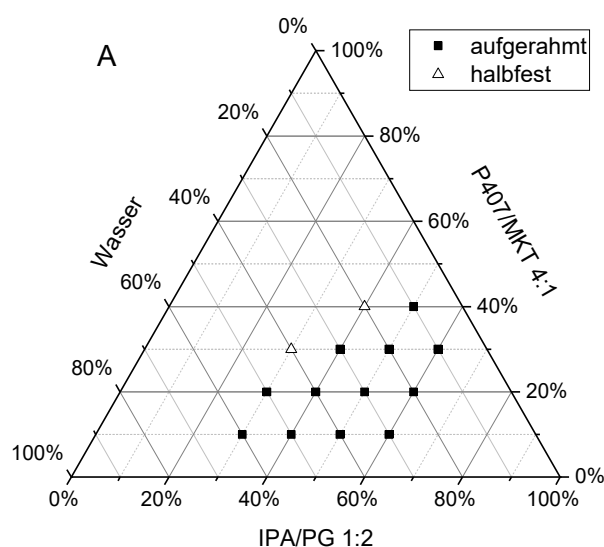


Abbildung 4.1: Konsistenz und Homogenität wirkstofffreier P407-basierter Formulierungen nach einer Woche Lagerung bei 30°C.

Die Veränderungen des makroskopischen Erscheinungsbildes durch Variation der Mischungsverhältnisse wurde ebenfalls betrachtet. Abbildung 4.2 zeigt das makroskopische Erscheinungsbild der Formulierungen mit den drei untersuchten Variationen. Einige der Formulierungen an der Grenze zwischen halbfestem und flüssigem Bereich wiesen eine andere Konsistenz auf als beim ursprünglichen Mischungsverhältnis. Die Formulierungen 3030 und 3030\_12 waren halbfest, während die Formulierungen 3030\_21 und 3030\_32 eine zähflüssige Konsistenz hatten. Am Beispiel 4040 zeigt sich ein ähnliches Bild: 4040\_12 hatte eine halbfeste Konsistenz, 4040 war zähflüssig und die beiden Formulierungen 4040\_21 und 4040\_32 wurden als dünnflüssig eingestuft. Die Veränderung des Verhältnisses IPA/PG zugunsten von PG erhöhte also die Konsistenz.

In früheren Untersuchungen wurde bereits festgestellt, dass eine Mischung von IPA und DMIS eine konsistenzverringende Wirkung hatte (van Hemelrijck und Müller-Goymann, 2012). Dort wurde vermutet, dass IPA Wasserstoffbrückenbindungen mit P407 eingeht, wodurch die Interaktion mit Wasser und somit die Quellung gestört wird. Hierdurch wird die Bildung von Mizellgerüsten abgeschwächt.

Auch die Änderung des Verhältnisses P407/MKT zu geringeren P407-Anteilen führte zu einer Konsistenzverringering, da dann weniger P407 zur Bildung von Mizellgerüsten zur Verfügung steht.



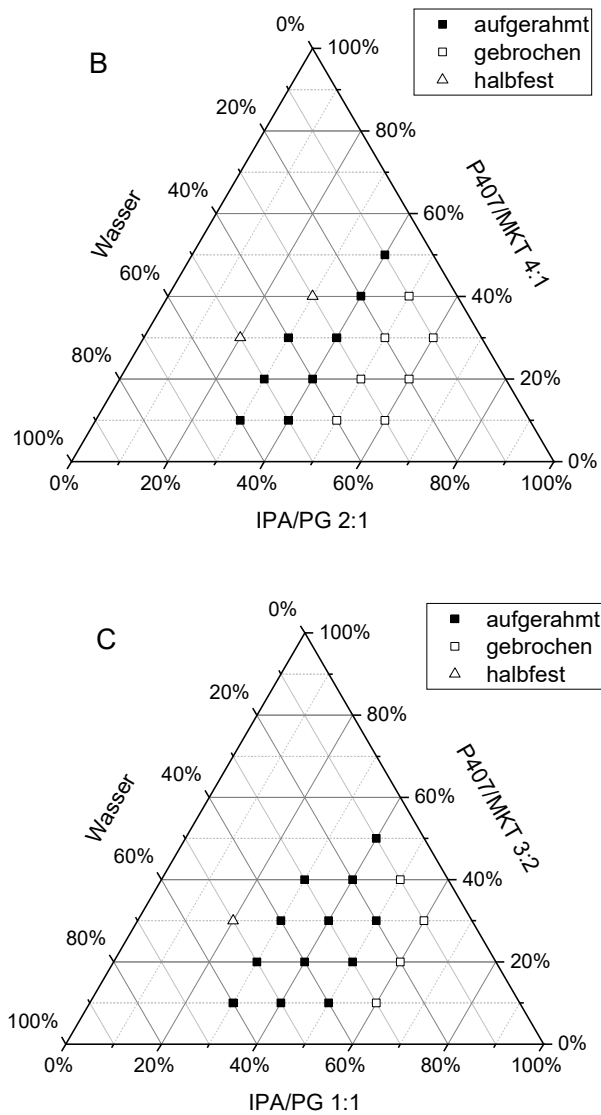


Abbildung 4.2: Konsistenz und Homogenität wirkstofffreier P407-basierter Formulierungen nach einer Woche Lagerung bei 30°C nach Variation der Mischungsverhältnisse. A: IPA/PG 1:2; B: IPA/PG 2:1; C: P407/MKT 3:2

#### 4.1.2 Bestimmung der Sättigungslöslichkeit

Da es sich bei SRT um eine lipophile Substanz handelt und die eingesetzten Formulierungen mehrere polare Lösemittel enthielten, war die Sättigungslöslichkeit ein entscheidender Faktor für die Entwicklung. Zunächst wurde die Löslichkeit in Einzelkomponenten bestimmt, um herauszufinden, welchen Einfluss sie in der Gesamtformulierung haben können. Anschließend wurde die Sättigungslöslichkeit in mehreren flüssigen Formulierungen bestimmt.

Abbildung 4.3 zeigt die Sättigungslöslichkeit von SRT in den Einzelkomponenten. Ethanol wurde als mögliche Alternative zu IPA mit einbezogen. Die Löslichkeit in Wasser ist erwartungsgemäß gering und entspricht dem Literaturwert von  $<0,01\%$  (Albet et al., 1992). In MKT ist die Löslichkeit ebenfalls gering, was durch das Vorliegen des Nitratsalzes begründet ist. Die Löslichkeit in IPA beträgt unter Berücksichtigung der Dichte etwa  $0,21\%$ , in Ethanol  $1,05\%$  und in PG  $1,46\%$  (jeweils m/m). Da die Löslichkeit in Ethanol deutlich höher war als in IPA, wurden in den folgenden Löslichkeitsversuchen auch Formulierungen mit Ethanol statt IPA berücksichtigt.

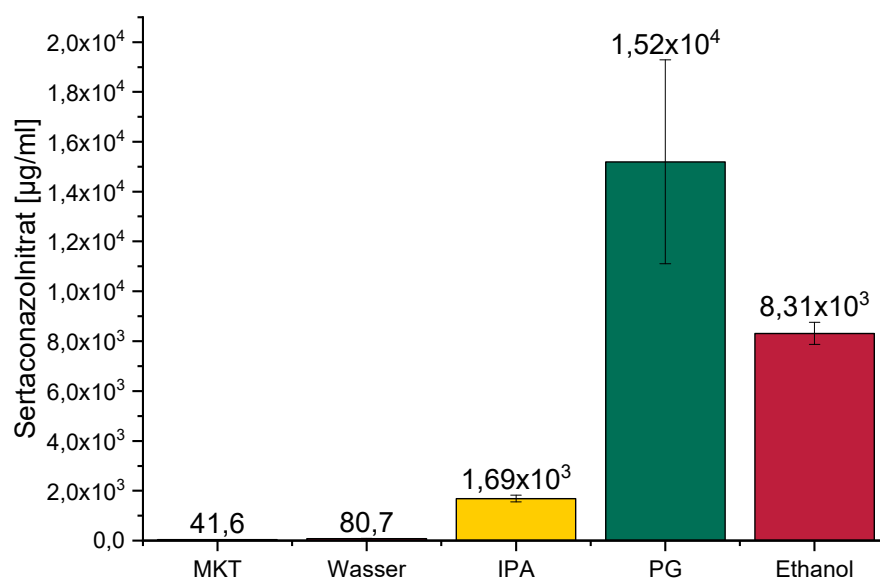


Abbildung 4.3: Sättigungslöslichkeit von SRT in Einzelkomponenten, n=3.

Der nächste Schritt war die Bestimmung der Sättigungslöslichkeit in den Formulierungen. Zunächst wurden wässrige und ölige Phase getrennt untersucht, um herauszufinden, in welcher Phase sich SRT hauptsächlich aufhielt. Am Beispiel der Formulierung 3050 wurde für die wässrige Phase ein SRT-Gehalt von  $1,50\% \pm 0,025\%$  und für die ölige Phase ein SRT-Gehalt von  $1,04\% \pm 0,04\%$  gefunden. Bei der ethanolhaltigen Variante 3050\_E war die Konzentration in der wässrigen Phase  $1,55\% \pm 0,025\%$  und in der öligen Phase  $0,81\% \pm 0,002\%$ . Da somit in beiden Phasen relevante Mengen an Wirkstoff enthalten waren, wurden alle weiteren Versuche mit der homogenisierten Gesamtformulierung durchgeführt.



Die gemessenen SRT-Sättigungslöslichkeiten in den Formulierungen 3050 und 3050\_E geben auch Aufschluss über die Beeinflussung der Löslichkeit durch den Austausch von IPA durch Ethanol. Der Gehalt in der wässrigen Phase lag bei der ethanolhaltigen Variante um 0,05 Prozentpunkte höher, der Gehalt in der öligen Phase um 0,23 Prozentpunkte niedriger. Unter Berücksichtigung der Mengenverhältnisse der beiden Phasen war die Wirkstoffmenge in der Gesamtformulierung als ähnlich anzusehen. Aus diesem Grund konzentrierte sich die weitere Arbeit auf Formulierungen mit dem bereits etablierten IPA.

Bei den Formulierungen mit den ursprünglichen Mischungsverhältnissen IPA/PG 1:1 und P407/MKT 4:1 zeigte sich, dass die Sättigungslöslichkeiten bei Formulierungen mit gleichem Wassergehalt kaum voneinander abwichen. Bei den Formulierungen mit einem Wassergehalt von 20% (m/m) wurde ein maximaler Gehalt von 1,52% bis 1,61% erzielt (Abbildung 4.4). Bei Verringerung des Wassergehalts nahm die Sättigungslöslichkeit stufenweise ab, bei der Formulierung 1030 mit einem Wassergehalt von 60% (m/m) ließen sich nur noch 0,35% (m/m) einarbeiten. Ein Austausch von P407/MKT durch IPA/PG und umgekehrt hat somit nur einen geringen Effekt auf die Sättigungslöslichkeit.

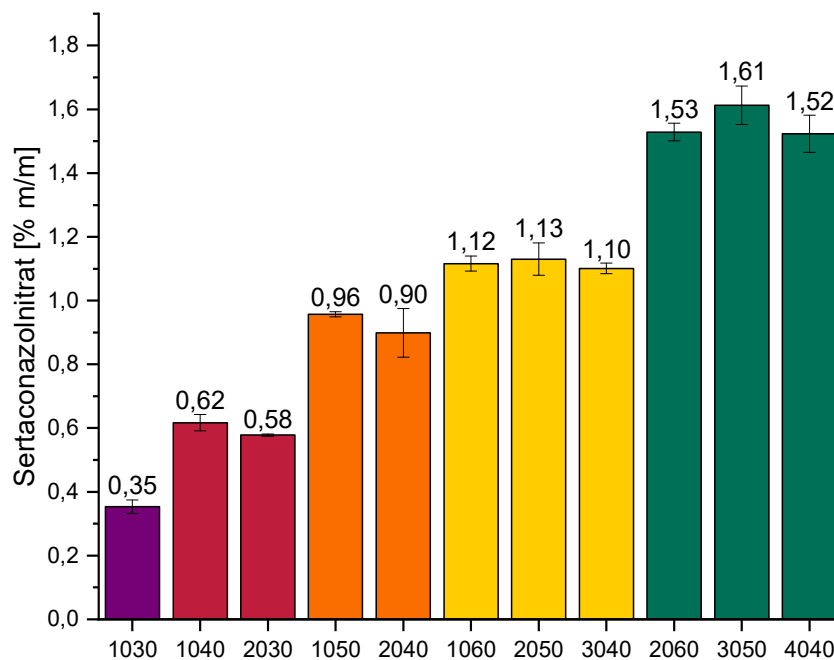


Abbildung 4.4: Sättigungslöslichkeit von SRT in verschiedenen P407-basierten Formulierungen bei 20°C, n=3. Formulierungen mit gleichem Wassergehalt einheitlich gefärbt.

Die Variation der Mischungsverhältnisse P407/MKT und IPA/PG nach 3.2.1 war ein weiterer möglicher Einfluss auf die Löslichkeit von SRT, weshalb alle Varianten am Beispiel der drei Formulierungen 2030, 2040 und 3040 getestet wurden. In Abbildung 4.5 sind die Ergebnisse denen der ursprünglichen Mischungsverhältnisse gegenübergestellt. Bei Änderung des Verhältnisses IPA/PG nach 1:2 und 2:1 war die Löslichkeit von SRT ähnlich wie beim Verhältnis 1:1, signifikante Unterschiede konnten nicht beobachtet werden. Die höhere Sättigungslöslichkeit in reinem PG im Vergleich zu reinem IPA wirkte sich somit nicht auf die Sättigungslöslichkeit in der Gesamtformulierung aus. Bei Änderung des Verhältnisses P407/MKT von 4:1 nach 3:2 war die Löslichkeit bei den Formulierungen 2030 und 3040 signifikant niedriger als zuvor. Die Reduktion des P407-Gehalts hatte also einen stärkeren Einfluss auf die Löslichkeit als die Zunahme an MKT, was aufgrund der niedrigen Löslichkeit von SRT in reinen MKT zu erwarten war.

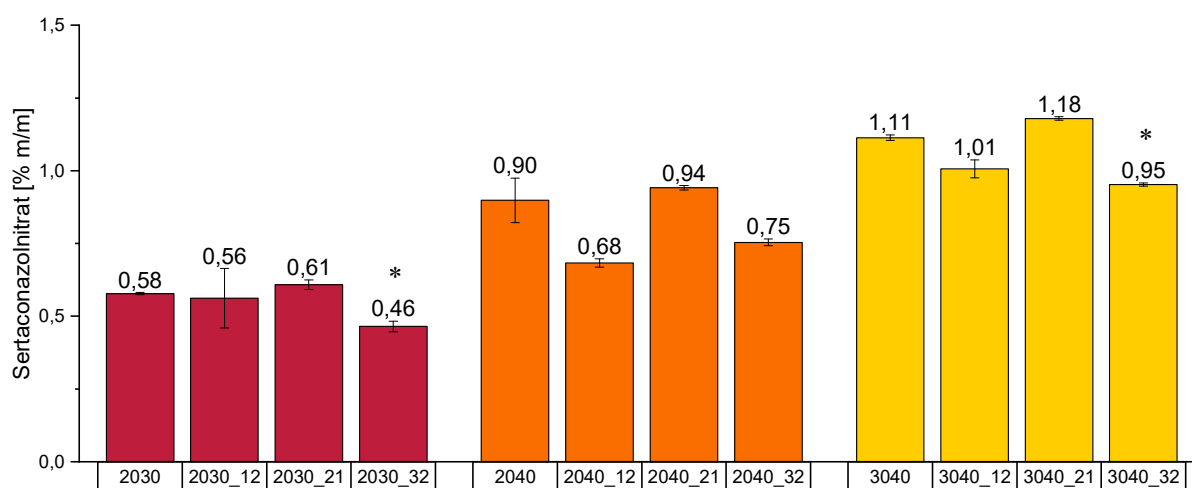


Abbildung 4.5: Sättigungslöslichkeit von SRT in P407-basierten Formulierungen mit variierten Mischungsverhältnissen, n=3. Signifikanz im Vergleich zur Formulierung ohne Variation der Mischungsverhältnisse mit Stern markiert.

#### 4.1.3 Stabilitätsuntersuchungen wirkstofffreier Formulierungen

Zur Beurteilung der Lagerfähigkeit der Formulierungen wurde deren Lagerstabilität untersucht. Dabei wurden sowohl makroskopische als auch mikroskopische Kriterien verwendet, um Veränderungen in der Konsistenz, Farbe oder Größe der

Emulsionstropfen zu beobachten. Vor allem die physikalische Stabilität war hier interessant, da es bei Emulsionstropfen in Mikrometer-Bereich relativ bald zur Aufräumung kam und die Gefahr der Koaleszenz bestand. Getestet wurden die unter 4.1.1 charakterisierten flüssigen Formulierungen sowie einige der halbfesten Formulierungen an der Grenze zum flüssigen Bereich, um eine etwaige Verflüssigung während der Lagerung beobachten zu können.

#### 4.1.3.1 Änderungen der makroskopischen Eigenschaften wirkstofffreier Formulierungen

Makroskopische Veränderungen waren vor allem durch die Aufräumung der Emulsionstropfen zu beobachten. Abbildung 4.6 zeigt eine Reihe von Formulierungen mit 30% Anteil P407/MKT und variablem Anteil IPA/PG bzw. Wasser nach vier Wochen und nach 24 Wochen Lagerzeit. Die Formulierungen mit wenig IPA/PG, die wie unter 4.1.1 beschrieben eine halbfeste Konsistenz aufwiesen, veränderten sich in diesem Zeitraum nicht. Bei den Formulierungen mit 40% und 50% IPA/PG war nach vier Wochen Aufräumung zu erkennen, während die Emulsion mit 60% IPA/PG gebrochen war. Nach 10 Wochen Lagerzeit war es auch bei allen Emulsionen mit 50% IPA/PG zur vollständigen Koaleszenz gekommen, wobei dies bei Formulierungen mit hohem Anteil P407/MKT früher geschah als bei solchen mit niedrigem Anteil P407/MKT. Nach 24 Wochen waren keine weiteren Veränderungen zu beobachten, die Formulierungen mit 40% und weniger IPA/PG blieben stabil aufgerahmt.

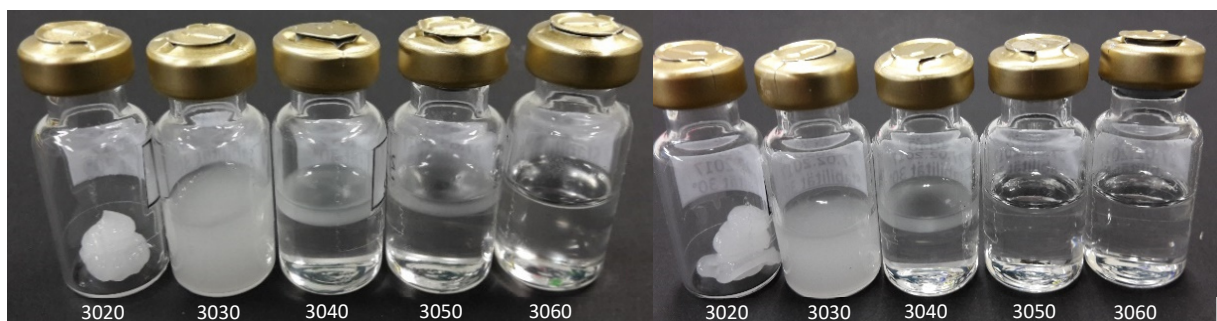


Abbildung 4.6: Formulierungen mit 30% P407/MKT und variablem Anteil IPA/PG und Wasser, vier Wochen nach Herstellung (links) und 24 Wochen nach Herstellung (rechts).

Einen Einfluss auf die Neigung zur Koaleszenz hat die dynamische Viskosität der Formulierungen. Durch höhere Anteile IPA/PG sank die Viskosität (siehe Abschnitt 4.5.1), sodass die Beweglichkeit der Emulsionstropfen erhöht und die Koaleszenz begünstigt wurde. Nicht untersucht wurde die Verteilung von P407 zwischen der Grenzfläche der Emulsionstropfen und der äußeren Phase. Denkbar ist, dass die Zugabe von IPA/PG diese Verteilung verschiebt und weniger P407 in der Grenzfläche zur Verfügung steht, was eine weitere Erklärung für die Neigung zur Koaleszenz wäre.

Die Aufschüttelbarkeit blieb während des gesamten Lagerzeitraums gleich. Aufgrund ihrer hohen Viskosität wurden die Formulierungen mit 30% und mehr P407/MKT als schwer homogenisierbar eingestuft. Bei 20% und weniger P407/MKT waren sie leicht homogenisierbar. Die Formulierungen mit niedrigem P407/MKT-Gehalt wären somit geeignet, auch nach längerer Lagerungszeit durch manuelles Schütteln durchmischt zu werden, um eine homogene Verteilung der Emulsionstropfen vor der Anwendung zu erreichen.

Bei Formulierungen mit einem Mischungsverhältnis IPA/PG von 1:2 brachen die Emulsionen mit 60% IPA/PG nicht gleich zu Beginn, sondern erst nach einer Lagerzeit von 10 Wochen. Formulierungen mit 50% IPA/PG und weniger blieben hier während der gesamten 24 Wochen Lagerzeit stabil aufgerahmt. Der Bereich der stabilen Emulsionen im Mischungsdiagramm ist somit um einen 10%-Schritt erweitert.

Beim Mischungsverhältnis IPA/PG 2:1 kehrte sich diese Beobachtung um: Formulierungen mit 50% IPA/PG brachen bereits innerhalb einer Woche. Nach 24 Wochen zeigten die Formulierungen 3040 und 4040 ebenfalls makroskopisch sichtbare Öltropfen, die als vollständige Koaleszenz gewertet wurden.

Der Austausch von PG durch IPA hat demnach einen destabilisierenden Effekt auf die Emulsionstropfen. Dies kann wie zuvor beschrieben durch die sinkende Viskosität (siehe Abschnitt 4.5.1) und eine Verschiebung der Verteilung von P407 verursacht werden. Maßgeblich für den destabilisierenden Effekt der Mischung IPA/PG war damit IPA.

Zuletzt wurde das Mischungsverhältnis P407/MKT 3:2 getestet. In Abbildung 4.7 sind Formulierungen mit 30% P407/MKT und variablen Anteilen IPA/PG bzw. Wasser nach einem Tag und nach 24 Wochen Lagerzeit dargestellt. Die halbfeste Formulierung 3020\_32 veränderte sich während der Lagerung nicht. 3030\_32 und 3040\_32 waren

nach 24 Wochen stabil aufgerahmt, bei 3050\_32 und 3060\_32 war Koaleszenz zu beobachten.

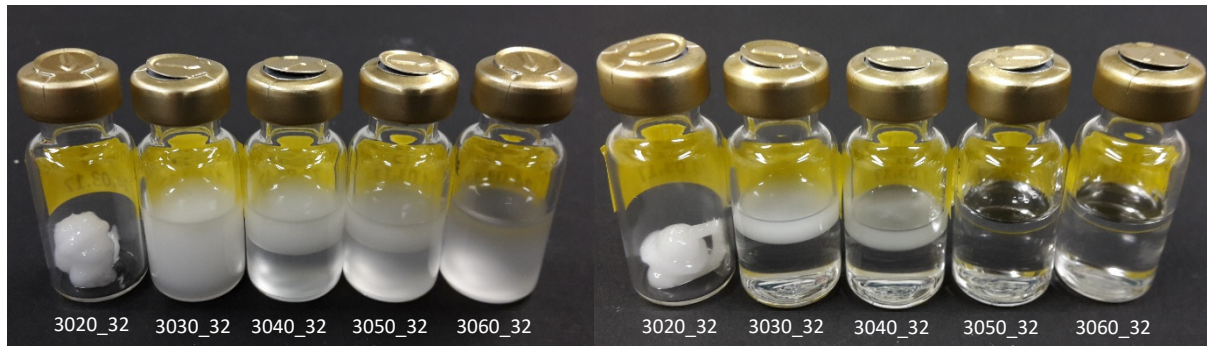


Abbildung 4.7: Veränderungen der Formulierungen 3020\_32 bis 3060\_32. Links: Nach einem Tag, Rechts: Nach 24 Wochen.

Die Stabilität der Emulsionen war bei niedrigen Anteilen P407/MKT ähnlich wie bei den ursprünglichen Mischungsverhältnissen: Formulierungen mit 60% IPA/PG brachen innerhalb einer Woche, bei 50% IPA/PG kam es nach längerer Lagerzeit zur Koaleszenz. Bei höheren Anteilen P407/MKT war die Stabilität jedoch geringer als bei den ursprünglichen Mischungsverhältnissen, die Formulierungen 4040\_32 und 5040\_32 zeigten ebenfalls Koaleszenz. Bei Austausch von P407/MKT durch Wasser wurden die Formulierungen stabiler: Die Formulierung 4050\_32 brach bereits nach einer Woche, 3050\_32 nach 10 Wochen, 2050\_32 nach 24 Wochen und die Formulierung 1050\_32 war auch nach 24 Wochen noch stabil aufgerahmt. Ein niedrigerer Anteil P407/MKT wirkte sich also positiv auf die Stabilität aus. Dies ist beim Mischungsverhältnis P407/MKT 3:2 noch deutlicher zu erkennen als beim Verhältnis 4:1. Denkbar ist, dass die Unterschiede in der Stabilität durch die absolute Menge MKT verursacht werden. Bei hohen Anteilen P407/MKT und somit hoher absoluter Menge MKT ist die Anzahl der Emulsionstropfen größer, sodass sie sich räumlich näher sind und eine Interaktion zwischen den Tropfen wahrscheinlicher wird. Die Unterschiede zwischen den Formulierungen waren beim Mischungsverhältnis P407/MKT 3:2

deutlicher sichtbar, da sich der absolute MKT-Gehalt bei Erhöhung des Anteils P407/MKT doppelt so stark ändert wie beim Mischungsverhältnis 4:1.

Der Vergleich der Stabilitäten des P407/MKT-Verhältnisses 3:2 und des IPA/PG-Verhältnisses 2:1 zeigt, dass nicht nur die Viskosität eine Rolle bei der Tendenz zur Koaleszenz spielt: Die Viskositäten der erstgenannten Formulierungen sind ähnlich oder sogar niedriger (siehe Abschnitt 4.5.1), trotzdem sind sie stabiler. Dies bestärkt die Vermutung, dass IPA einen darüber hinausgehenden destabilisierenden Effekt hat.

#### **4.1.3.2 Änderungen der mikroskopischen Eigenschaften wirkstofffreier Formulierungen**

Da es makroskopisch zu Aufräumung und Koaleszenz der Emulsionen kam, war im mikroskopischen Bild vor allem die Größe der Emulsionstropfen im zeitlichen Verlauf interessant. Hierfür wurden jeweils d10, d50 und d90 als charakteristische Größen bestimmt. Unmittelbar nach Herstellung lagen alle Tropfengrößen im unteren Mikrometer-Bereich. Bei Lagerung nahm die Tropfengröße aller Emulsionen wie erwartet zu. Bei der Formulierung 1030 stieg der d90-Wert von 4,8µm in Woche 1 auf 15,6µm in Woche 24 (Abbildung 4.8). Bei Austausch von Wasser durch IPA/PG am Beispiel der Formulierung 1040 war das Wachstum der Tropfen stärker ausgeprägt, hier stieg der d90-Wert auf 25,9µm in Woche 24. Außerdem war zu erkennen, dass der Median deutlich näher am d10-Wert lag als am d90-Wert. Demnach lag hier eine asymmetrische Partikelgrößenverteilung vor, mit einer Verschiebung des Medians zu kleinen Partikelgrößen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass während der Lagerung größere Tropfen zusammenfließen, während kleinere Tropfen vereinzelt bleiben. Dadurch sinkt die Anzahl der Tropfen oberhalb des ursprünglichen Medians und der Median wird zu kleineren Partikelgrößen verschoben. Das stärkere Wachstum der Tropfen unterstützt die Beobachtung aus den makroskopischen Untersuchungen, dass ein hoher Anteil IPA/PG einen destabilisierenden Effekt hat.

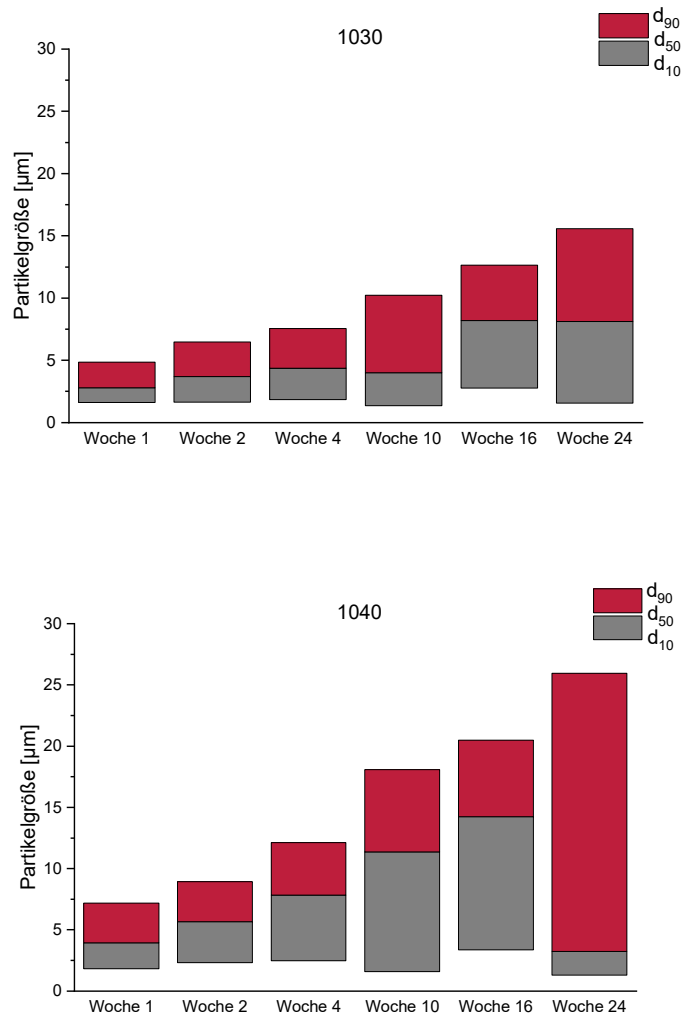


Abbildung 4.8: Zeitlicher Verlauf der Partikelgrößen (Median, d10, d90) der Formulierungen 1030 und 1040 im Vergleich.

Bei Austausch von Wasser durch P407/MKT von 1040 zu 2040 war das Tropfengrößenwachstum ebenfalls stärker ausgeprägt (Abbildung 4.9), der d90-Wert erreichte 36,8µm in Woche 24 bei der Formulierung 2040. Bei weiterer Erhöhung des P407/MKT-Anteils war das Wachstum jedoch wieder weniger stark ausgeprägt – die Formulierung 3040 erreichte in Woche 24 einen Median von 24,7µm, die Formulierung 4040 einen Median von 10,0µm. Zu vermuten ist, dass in der Reihe 2040 – 3040 – 4040 durch die steigende Viskosität die Beweglichkeit der Emulsionstropfen eingeschränkt war und diese weniger miteinander in Berührung kommen können. Beim Vergleich 1040 – 2040 fiel die Änderung der Viskosität geringer aus (siehe Abschnitt 4.5.1), gleichzeitig verdoppelte sich der Anteil an MKT. Dadurch war die Dichte der Emulsionstropfen deutlich höher und eine Interaktion wurde wahrscheinlicher, was sich stärker auswirkt als die Erhöhung der Viskosität.

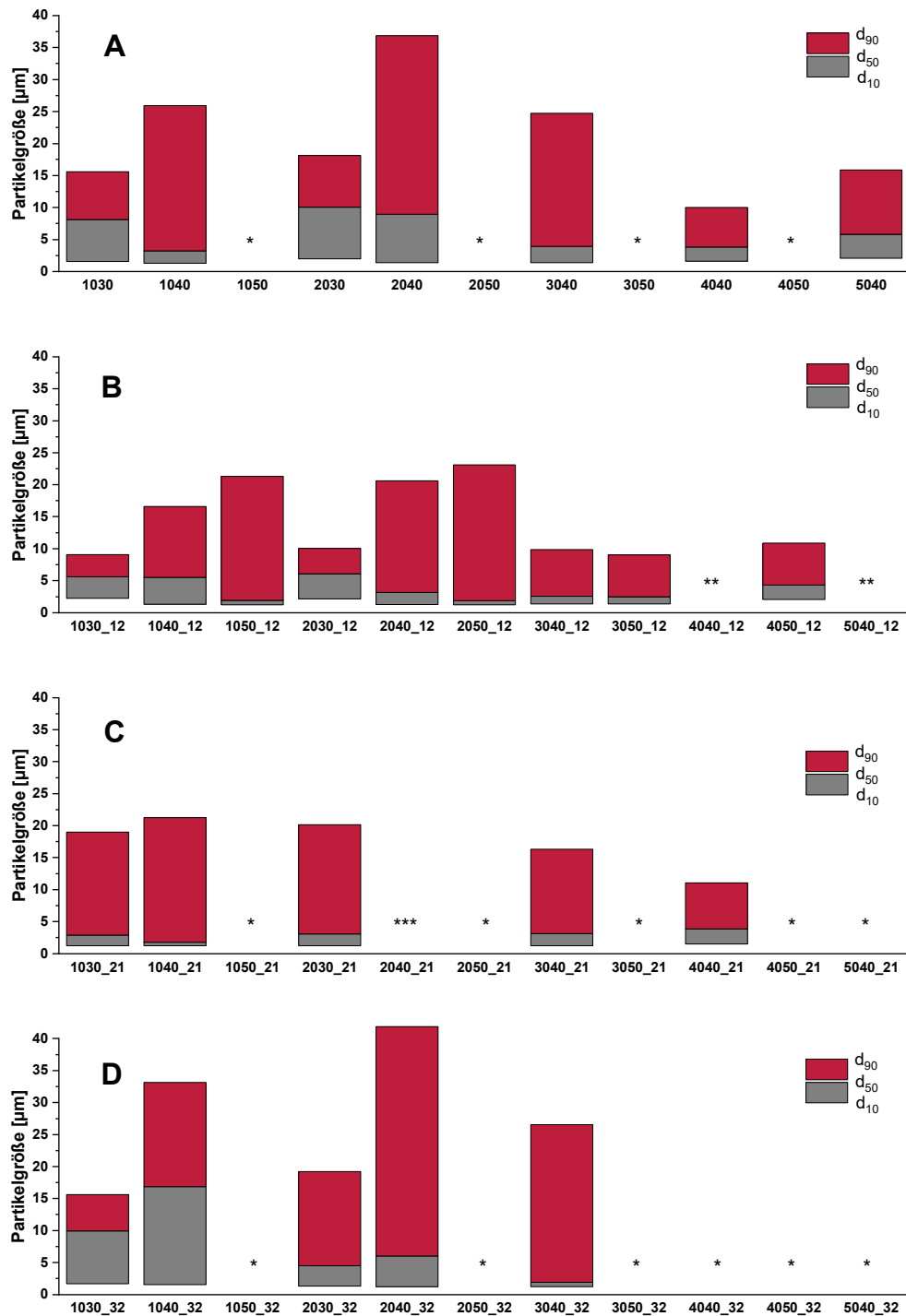


Abbildung 4.9: Partikelgröße (d10, d50, d90) verschiedener P407-basierter Formulierungen nach 24 Wochen Lagerung bei 30°C, mikroskopisch bestimmt (n=2). A: Ursprüngliche Zusammensetzung. B: Variation des Verhältnisses IPA/PG zu 1:2. C: Variation des Verhältnisses IPA/PG zu 2:1. D: Variation des Verhältnisses P407/MKT zu 3:2.

\*vollständige Koaleszenz \*\* halbfeste Formulierung \*\*\* Tropfen makroskopisch erkennbar, vollständige Koaleszenz in naher Zukunft erwartet.



Bei Variation der Mischungsverhältnisse bestätigten sich die Beobachtungen der makroskopischen Charakterisierung. Die Änderung des Verhältnisses IPA/PG von 1:1 nach 1:2 führte bei allen Formulierungen zu kleineren Tropfengrößen nach 24 Wochen (Abbildung 4.9 B). Auch hier verursachte ein höherer Anteil IPA/PG ein stärkeres Tropfengrößenwachstum, erkennbar an den Reihen 1030\_12 – 1040\_12 – 1050\_12 und 2030\_12 – 2040\_12 – 2050\_12. Der Austausch von P407/MKT zu Wasser in der Reihe 1040\_12 – 2040\_12 – 3040\_12 führte wie zuvor zu einem Stabilitätsminimum bei Formulierung 2040\_12.

Beim Mischungsverhältnis IPA/PG 2:1 war das Wachstum der Tropfen ausgeprägter als beim Verhältnis 1:2 (Abbildung 4.9 C), was wie bereits beschrieben auf den destabilisierenden Effekt von IPA hinweist.

Bei Änderung des Verhältnisses P407/MKT von 4:1 zu 3:2 erhöhten sich die d90-Werte der untersuchten Formulierungen geringfügig, Formulierungen mit höheren Gehalten IPA/PG resultierten auch hier in größeren Emulsionstropfen (Abbildung 4.9 D). Zusammen mit der makroskopisch beobachteten Koaleszenz der Formulierungen 4040\_32 und 5040\_32 erschien die physikalische Stabilität der Emulsionen geringer, das Verhältnis 4:1 von Emulgator zu Ölphase war für die Stabilisierung besser geeignet.

#### **4.1.4 Stabilitätsuntersuchungen wirkstoffhaltiger Formulierungen**

Aufgrund der Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen wirkstofffreier Formulierungen sowie der Bestimmung der Sättigungslöslichkeit von SRT wurden Formulierungen ausgewählt, mit denen Stabilitätsuntersuchungen nach Einarbeitung von SRT durchgeführt werden sollten. Formulierungen, die nach 24 Wochen koalesziert waren, wurden hierfür ausgeschlossen. Auch hochviskose Emulsionen, die als „schwer aufschüttelbar“ eingestuft waren, wurden nicht weiter berücksichtigt. Die Formulierungen, die in diesem Abschnitt untersucht wurden, sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

Tabelle 4.1: Ausgewählte Formulierungen für die Stabilitätsuntersuchungen.

Untersuchte Formulierungen	
1.	0,3S1030
2.	0,5S1040
3.	0,5S2030
4.	0,8S2040
5.	1S3040
6.	1S4040

#### 4.1.4.1 Änderungen der makroskopischen Eigenschaften wirkstoffhaltiger Formulierungen

Bei makroskopischer Betrachtung der eingelagerten Formulierungen waren vor allem Veränderungen der Aufrahmtendenz durch die Einarbeitung von Wirkstoff interessant. Da die eingearbeitete Menge an SRT mit Ausnahme der Formulierungen 1S4040 nur zwischen 0,05 und 0,1 Prozentpunkten unterhalb der Sättigungslöslichkeit (vgl. 4.1.2) lag, wurde auf mögliche Auskristallisierung von SRT geachtet. Außerdem wurde beobachtet, ob etwaige Verfärbungen Hinweise auf chemische Instabilitäten gaben.

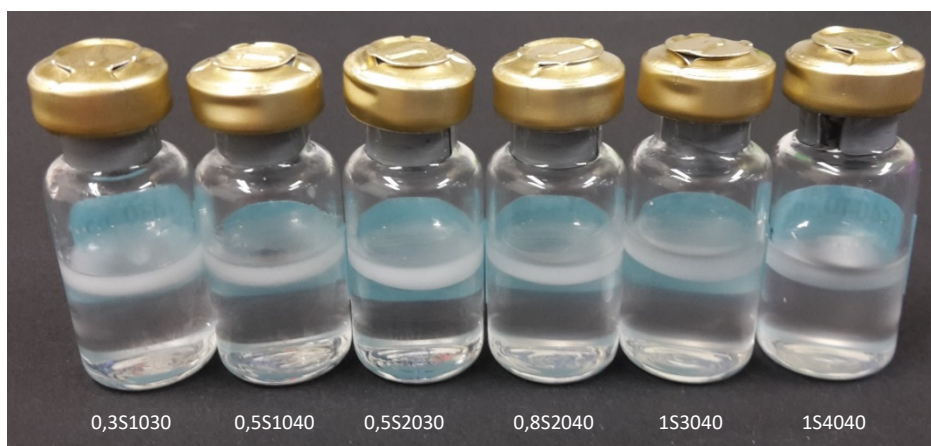


Abbildung 4.10: Makroskopisches Erscheinungsbild wirkstoffhaltiger P407-basierter Formulierungen nach 24 Wochen Lagerung bei 30°C.

Nach 24 Wochen Lagerzeit waren alle sechs Emulsionen aufgerahmt, Koaleszenz war nicht zu erkennen (Abbildung 4.10). Durch Schwenken bzw. leichtes Schütteln konnten

die aufgerahmten Öltropfen redispergiert werden. Diese Beobachtungen waren identisch mit denen bei wirkstofffreien Formulierungen, die Einarbeitung von SRT hatte demnach makroskopisch keine Auswirkungen auf deren Eigenschaften. Bei keiner der Proben konnten Kristallbildung oder Verfärbungen beobachtet werden, SRT blieb also über den gesamten Lagerzeitraum in Lösung und bildete keine gefärbten Abbauprodukte. Bei Lagerung bei Raumtemperatur kam es jedoch bei den Formulierungen 0,5S2030 und 0,8S2040 zur Bildung nadelförmiger Kristalle, die unter Berücksichtigung der anderen Bestandteile nur durch auskristallisierendes SRT verursacht sein konnten. Daraus folgte, dass es sich bei Raumtemperatur um übersättigte Lösungen handelte, die nur für eine begrenzte Zeit stabil blieben. Die Lagerung bei 30°C während der Stabilitätsuntersuchungen erhöhte die Löslichkeit von SRT in den Formulierungen, sodass diese Instabilität nicht sichtbar wurde. In der Folge wurde der Anteil SRT in den beiden Formulierungen um jeweils 0,05 Prozentpunkte reduziert, sodass sich die neuen Zusammensetzungen 0,45S2030 und 0,75S2040 ergaben. Die Formulierungen wurden erneut bei Raumtemperatur gelagert, dabei wurde nach 6 Monaten keine Kristallbildung beobachtet. Auch bei den anderen vier untersuchten Formulierungen kam es nach 6 Monaten Lagerung bei Raumtemperatur nicht zur Auskristallisation von SRT.

#### **4.1.4.2 Änderungen der mikroskopischen Eigenschaften wirkstoffhaltiger Formulierungen**

Bei mikroskopischer Betrachtung zeigte sich wie auch schon bei den wirkstofffreien Formulierungen ein Wachstum der Emulsionstropfen während der Lagerung. Das Ausmaß des Tropfenwachstums unterschied sich nur geringfügig von den Ergebnissen der wirkstofffreien Formulierungen (Abbildung 4.11). Der geringste d90-Wert nach 24 Wochen wurde mit 8,0µm bei der Formulierung 1S4040 beobachtet, gefolgt von der Formulierung 0,3S1030 (18,9µm). Die Formulierung 0,8S2040 erreicht aufgrund ihrer niedrigen Viskosität und ihrem hohen Anteil IPA/PG den höchsten d90-Wert von 36,3µm.

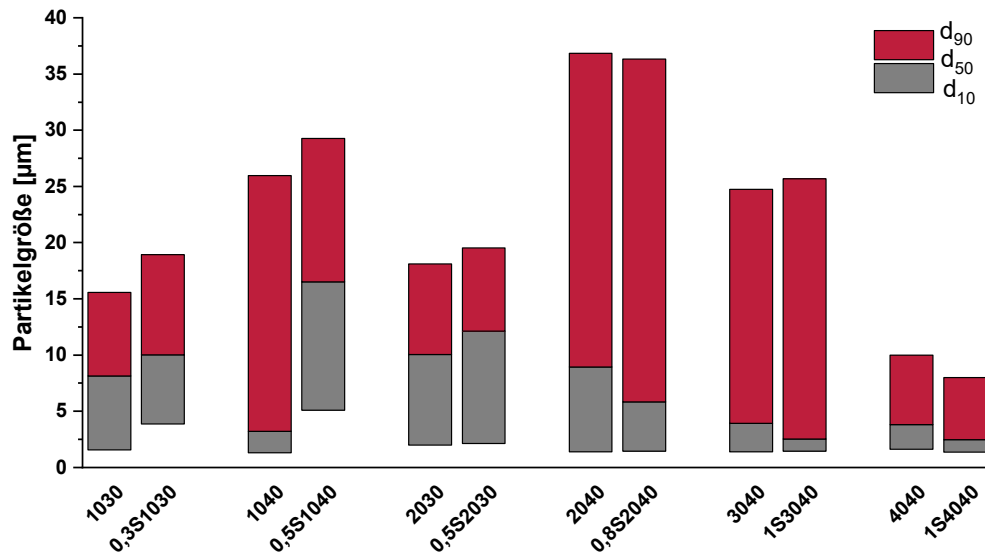


Abbildung 4.11: Tropfengröße P407-basierter Formulierungen nach 24 Wochen Lagerung bei 30°C, n=2. Links jeweils wirkstofffreie, rechts wirkstoffhaltige Variante.

Nach 24 Wochen Lagerzeit wurden die Formulierungen 0,3S1030 und 0,8S2040 kräftig geschüttelt, um herauszufinden, ob manueller Energieeintrag die Größe der Emulsionstropfen wieder reduzieren konnte. Dies wäre dann einem potenziellen Anwender zu empfehlen, um vor Anwendung eine immer ähnliche Tropfengröße sicherzustellen. Bei Formulierung 0,3S1030 wurde der d<sub>90</sub>-Wert von 18,4µm auf 13,2µm reduziert, bei der Formulierung 0,8S2040 von 34,1µm auf 9,4µm (Abbildung 4.12). Diese Werte liegen etwas über den Tropfengrößen nach Herstellung (0,3S1030: 4,4µm; 0,8S2040: 5,2µm), was aufgrund des deutlich höheren Energieeintrages mit dem bei der Herstellung verwendeten Dispergierwerkzeug zu erwarten war. Der relativ geringe Energieeintrag des manuellen Schüttelns reichte jedoch aus, um die Tropfen in einen Größenbereich zu bringen, der auch nach wenigen Wochen Lagerzeit erreicht wurde.

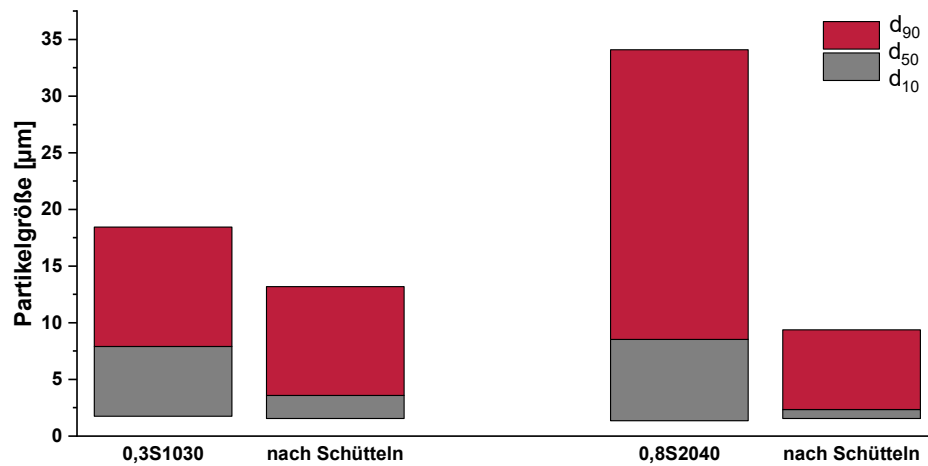


Abbildung 4.12: Tropfengröße der Formulierungen 0,3S1030 und 0,8S2040 nach 24 Wochen Lagerung bei 30°C. Jeweils links nach leichten Schwenken, rechts nach 30 Sekunden manuellem Schütteln.

#### 4.1.5 Chemische Stabilität von SRT in den Formulierungen

Vor der Bestimmung der chemischen Stabilität von SRT in den Formulierungen wurde zunächst die Wiederfindung von SRT bestimmt. Dies geschah an den Beispielen 1S3050, 1S3050\_E und 2S3060. Die Wiederfindung bei diesen drei Formulierungen lag bei 101,0% (Standardabweichung 0,7%), 101,1% (Standardabweichung 1,0%) und 100,9% (Standardabweichung 0,1%).

Die Gehaltsbestimmung über 24 Wochen mittels HPLC ergab, dass sich der Anteil von SRT nach 24 Wochen nicht signifikant vom Ursprungsgehalt unterschied (Abbildung 4.13). Ein Abbau von SRT fand demnach in diesem Zeitraum nicht oder nur in geringem Ausmaß statt.

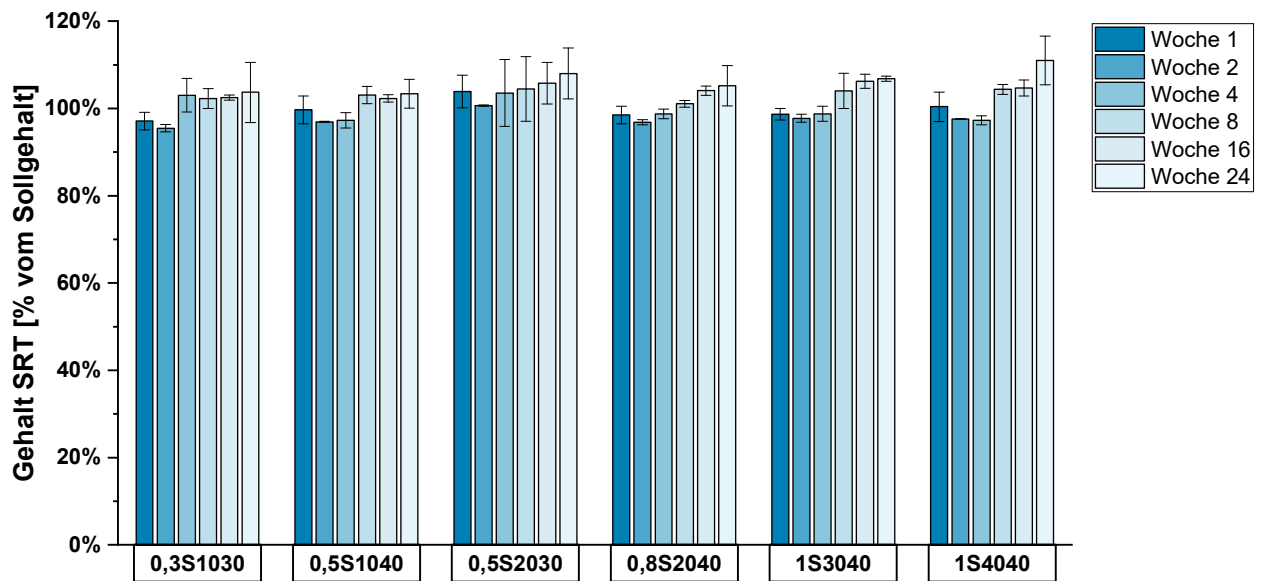


Abbildung 4.13: Gehalt von SRT in P407-basierten Formulierungen nach Lagerung bei 30°C zu unterschiedlichen Lagerzeitpunkten, n=2.

## 4.2 Permeationsuntersuchungen durch humanes Stratum corneum und durch Keratinfilme

### 4.2.1 Löslichkeit von SRT im Akzeptormedium und Einhaltung von sink-Bedingungen

Zu Beginn der Untersuchungen sollte zunächst ein Akzeptormedium gefunden werden, in dem SRT eine ausreichende Löslichkeit aufwies. Dafür wurde die Sättigungskonzentration in den in Tabelle 4.2 aufgeführten Zusammensetzungen getestet. Bei Verringerung des pH-Wertes stieg die Löslichkeit an. In reinem PBS (pH 7,4) war kaum SRT detektierbar, ebenso wenig nach Änderung des pH-Wertes auf 5,5. Bei pH 3,0 stieg die Löslichkeit von SRT auf 195 µg/ml. Bei niedrigen pH-Werten liegt der basische Stickstoff im SRT-Molekül protoniert vor, sodass die Löslichkeit in wässrigen Medien verbessert wird. Da 195 µg/ml noch als relativ gering angenommen wurden und bei weiterer Änderung des pH-Wertes keine weitere Löslichkeitsverbesserung zu erwarten war, wurden weitere Möglichkeiten getestet. Bei Zugabe von 20% PG und bei Zugabe von 10% IPA + 10% PG gab es keine deutliche Löslichkeitsverbesserung im Vergleich zu reinem PBS. Bei Zugabe von 10% IPA +20%

PG stieg die Löslichkeit auf 1387µg/ml an, bei 20% IPA + 20% PG erhöhte sie sich weiter auf 2602µg/ml.

Tabelle 4.2: Löslichkeit von SRT in unterschiedlichen Zusammensetzungen von Akzeptormedien.

Nr.	Anteil PBS [% V/V]	pH-Wert PBS	Anteil IPA [% V/V]	Anteil PG [% V/V]	Löslichkeit SRT [µg/ml]	SD [µg/ml]
1	100	7,4	-	-	<10	-
2	100	5,5	-	-	<10	-
3	100	3	-	-	195	2
4	80	7,4	10	10	<10	-
5	80	7,4	-	20	<10	-
6	70	7,4	10	20	144	3
7	60	7,4	20	20	1387	94
8	60	5,5	20	20	2602	18

Um eine Beeinflussung durch den pH-Wert möglichst gering zu halten und da eine Löslichkeit von über 1000µg/ml ausreichend erschien, wurde mit der Zusammensetzung 60% PBS 20% IPA 20% PG und dem pH-Wert 7,4 weitergearbeitet. Dieses Medium hatte den zusätzlichen Vorteil, dass IPA und PG in ähnlichen oder sogar gleichen Mengen in den zu testenden Formulierungen vorhanden waren. Permeationsbeeinflussende Effekte, die auch bei Änderung des pH-Wertes oder Zugabe von Tensiden zu erwarten waren, sollten so geringgehalten werden.

In späteren Wiederholungen des Versuchs zeigte sich, dass die tatsächliche Löslichkeit in dieser Mischung geringer war als zunächst ermittelt. Erster Hinweis darauf war eine leichte Eintrübung im Akzeptormedium bei sehr hohen permeierten Mengen (siehe Abschnitt 4.3.1), die auf eine Auskristallisation von SRT zurückgeführt werden könnte. In Abbildung 4.14 sind die Ergebnisse einer sechsfachen Bestimmung der Sättigungslöslichkeit von SRT in der Mischung 60% PBS 20% IPA 20% PG dargestellt. Bei einigen Versuchsansätzen wurden ähnliche Konzentrationen wie zuvor gefunden, die um 1000µg/ml schwankten. In anderen Durchführungen ergaben sich

jedoch erheblich niedrigere Konzentrationen um 100µg/ml. Die wahrscheinlichste Erklärung für diese Abweichungen sind ungelöste Nanokristalle, die nicht abzentrifugiert oder abfiltriert werden konnten. Wenn solche Nanokristalle vorhanden waren, konnten sie sich im Fließmittel der HPLC lösen und so eine höhere gelöste Menge SRT vortäuschen.

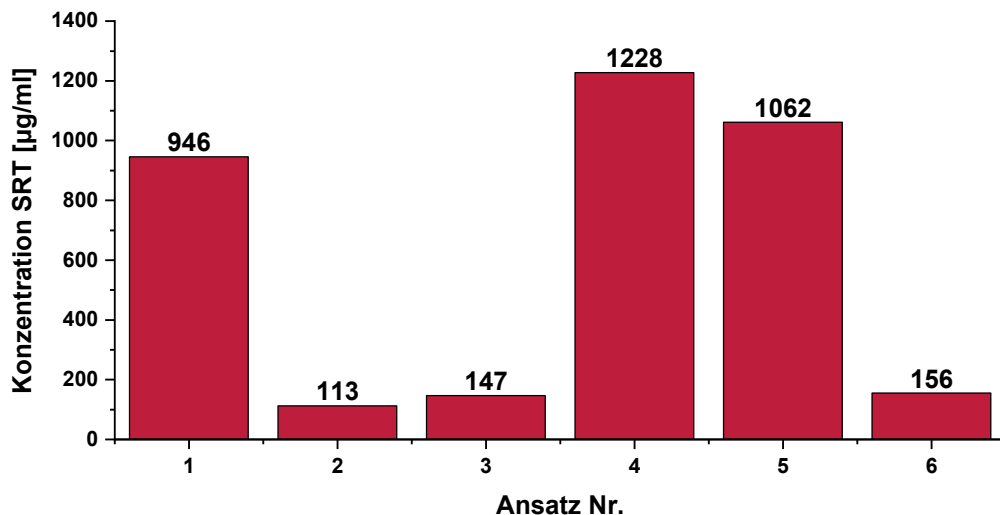


Abbildung 4.14: Bestimmte Sättigungskonzentration in der Zusammensetzung 60% PBS 20% IPA 20% PG, sechs unabhängige Einzelmessungen.

Um die tatsächliche Sättigungslöslichkeit in diesem Medium zu verifizieren, wurde mit unterschiedlichen Mengen SRT getestet, ob sich der Wirkstoff noch vollständig löste. Dabei wurde beobachtet, dass eine Zugabe von 50µg/ml zu einer klaren Lösung führte, während bei 75µg/ml noch ungelöste Kristalle zu sehen waren. Die Sättigungslöslichkeit lag also zwischen 50µg/ml und 75µg/ml und damit deutlich niedriger, als die ersten Messungen suggerierten.

Im Folgenden wurde die Sättigungslöslichkeit mit 50µg/ml angenommen, was nach diesem Ergebnis der niedrigste mögliche Wert ist. Dies bedeutet, dass in manchen Versuchen mehr als 10% der Sättigungslöslichkeit im Akzeptor erreicht wurde, sodass die sink-Bedingungen nicht eingehalten wurden. Dies betraf bei Permeationsversuchen mit SC jeweils eine Einzelmessung der Formulierungen 0,3S1030, 0,5S1040 und 0,45S2030 und bei Versuchen mit KF alle Formulierungen.



Um die Auswirkungen der Nichteinhaltung der sink-Bedingungen zu beurteilen, wurde im Rahmen einer Masterarbeit (Zichacek 2020) eine Permeation über 171 Stunden durchgeführt, um ein mögliches Abflachen der permeierten Wirkstoffmenge pro Zeit zu beobachten. Der Versuch wurde mit KF und der Formulierung 0,5S1040 durchgeführt, da in dieser Kombination die größten permeierten Mengen SRT erreicht wurden. Eine Abflachung der Steigung wurde ab Stunde 46 festgestellt (Abbildung 4.15). Somit konnten die hier erhobenen Daten bis Stunde 32 zur Auswertung verwendet werden.

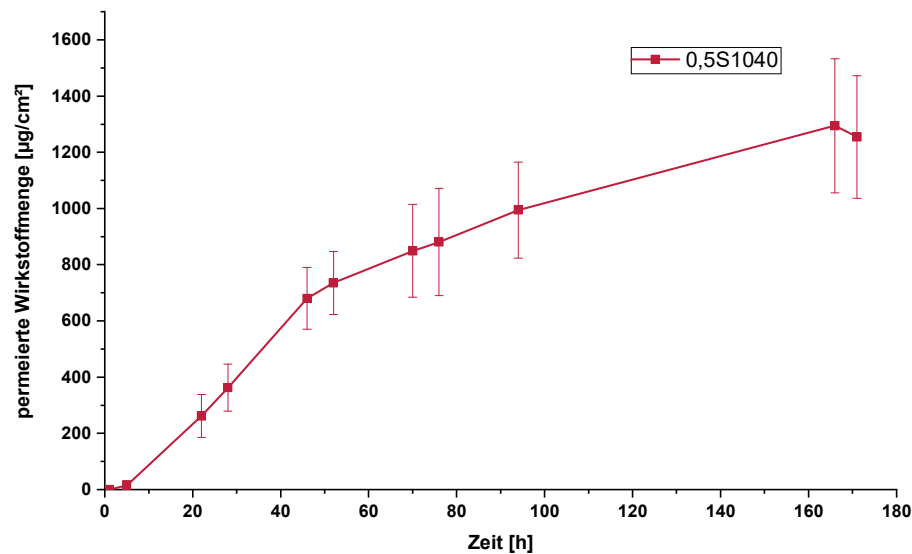


Abbildung 4.15: Permeierte Wirkstoffmenge pro Fläche aus 0,5S1040 durch KF, Mittelwert (n=6) (Zichacek 2020).

## 4.2.2 Permeationsuntersuchungen durch SC

### 4.2.2.1 Erste Permeationsserie

In der ersten Permeationsserie wurden vier der P407-basierten Formulierungen untersucht. Die permeierte Menge SRT pro SC-Fläche ist in Abbildung 4.16 gegen die Zeit aufgetragen. Große Unterschiede in der permeierten Wirkstoffmenge waren zu erkennen. Bei der Formulierung 0,5S1040 waren nach 28 Stunden durchschnittlich  $109\mu\text{g}/\text{cm}^2$  permeiert, bei der Formulierung 1S4040 waren es  $5,6\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Durch die hohen Standardabweichungen waren die Unterschiede jedoch nicht signifikant. Auf

eine Berechnung der Permeationskoeffizienten wurde deshalb verzichtet. In der Folge lag der Fokus zunächst darauf, eine höhere Präzision zu erreichen.

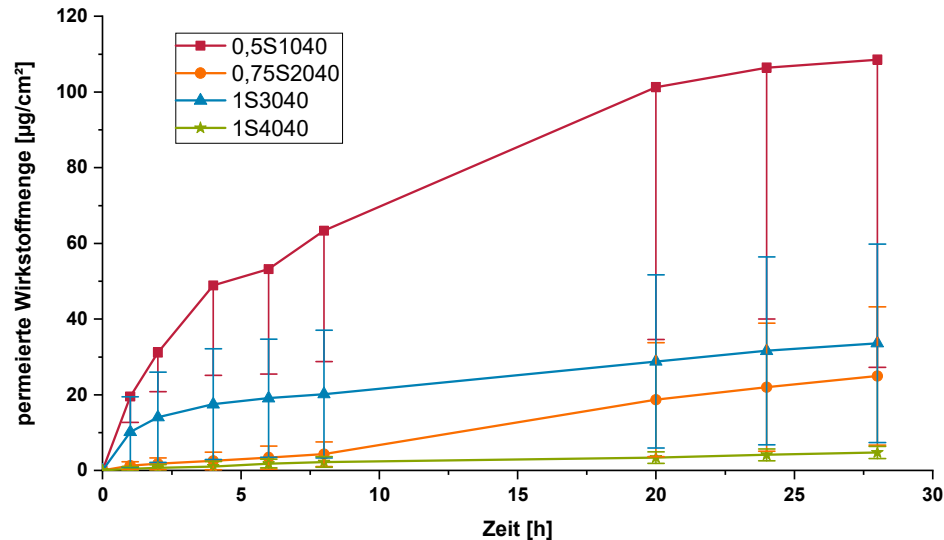


Abbildung 4.16: Permeierte Wirkstoffmenge pro Fläche aus P407-basierten Formulierungen durch SC, Mittelwerte (0,5S1040: n=4, 0,75S2040: n=6, 1S3040: n=4, 1S4040: n=2).

#### 4.2.2.2 Versuche zur Variabilität des SC

Nach der ersten Permeationsserie wurde vor jedem Versuch der TEER-Wert der SC-Stücke gemessen, um vor Versuchsbeginn vorhandene Beschädigungen des SC auszuschließen. Dabei stellte sich heraus, dass mit bloßem Auge als intakt angesehene Stücke teils niedrige TEER-Werte aufwiesen, was auf mikroskopische Beschädigungen hinweist und eine hohe Variabilität verursachen kann. Diese Stücke wurden entsprechend nicht verwendet.

Im Anschluss stellte sich die Frage, ob sich der TEER-Wert und damit die Durchlässigkeit des SC während des Versuches in unterschiedlichem Ausmaß ändert. Deshalb wurde der TEER-Wert zusätzlich nach Beendigung des Versuches bestimmt. Tabelle 4.3 zeigt die TEER-Werte vor und nach dem Versuch sowie die permeierte Wirkstoffmenge der jeweiligen Franzzellen. In allen Fällen nahm der TEER-Wert während des Versuches ab, die Werte nach Versuchsende lagen zwischen 3,3MΩ und 52MΩ. Dabei gibt es keine Korrelation zur permeierten Wirkstoffmenge, TEER-Wert und Durchlässigkeit des SC standen also nicht in direktem Zusammenhang. Die sehr

unterschiedlichen TEER-Werte bestätigten jedoch, dass das SC als natürliches Gewebe starken Schwankungen unterliegt und Stücke derselben Spenderin unterschiedlich auf Behandlung mit einer der Formulierungen reagieren können.

Tabelle 4.3: TEER-Werte einzelner Franzzellen vor und nach dem Permeationsexperiment sowie die permeierte Menge pro Fläche nach 30 Stunden Permeation.

	0,75S2040				1S3040			
Ansatz Nr.	1	2	3	4	1	2	3	4
TEER-Wert vorher [ $M\Omega$ ]	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
TEER-Wert nachher [ $M\Omega$ ]	37	3,3	37	19	16	52	47	24
Menge/Fläche [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]	5,7	13,0	10,8	8,5	5,1	22,1	9,3	6,4

Als zweiter Versuch zur Variabilität des SC wurde die Masse der SC-Stücke vor Versuchsbeginn bestimmt, um auf mögliche Unterschiede in der Dicke zu schließen. Dabei lag die Masse der Stücke im Mittel bei 2,022mg, die Standardabweichung betrug 0,152mg. Die maximale Abweichung vom Mittelwert war 16,9%. Eine Korrelation zwischen Masse des SC-Stücks und permeierter Wirkstoffmenge ließ sich nicht erkennen, sodass die SC-Masse als Ursache für die Schwankungen ausgeschlossen wurde.

#### 4.2.2.3 Zweite Permeationsserie

In der zweiten Permeationsserie wurden sechs P407-basierte Formulierungen verglichen. Zusätzlich zur nun durchgeführten Messung des TEER-Wertes wurde eine Hautspende verwendet, die erst einen Monat vor Versuchsbeginn entnommen wurde. So sollten lagerungsbedingte Veränderungen der Haut ausgeschlossen werden. Die exzidierten SC-Stücke wurden innerhalb eines Monats nach Exzision statt wie zuvor innerhalb von zwei Monaten für die Permeationsversuche verwendet.

Abbildung 4.17 zeigt die kumulative Menge permeierten SRTs aus den getesteten Formulierungen im zeitlichen Verlauf, bezogen auf die für die Permeation zur Verfügung stehende Fläche. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils vier bis acht

Versuchsdurchführungen. Der Arzneistoffflux wird in der Regel aus dem linearen Bereich der Permeationskurve bestimmt. Da bei den Versuchen mit SC anfangs oft ein steilerer Verlauf als gegen Ende der Permeation beobachtet wurde, war dies nicht einheitlich möglich. Um eine größtmögliche Vergleichbarkeit zu erreichen, wurden alle Permeationskoeffizienten aus der durchschnittlichen Steigung zwischen Stunde 4 und Stunde 30 (Stunde 24 für die abgebrochene Versuchsdurchführung) berechnet, wobei zu beachten ist, dass in einigen Fällen eine Berechnung im vorderen Teil der Kurve einen höheren und im hinteren Teil der Kurve einen niedrigeren Permeationskoeffizienten zur Folge hätte.

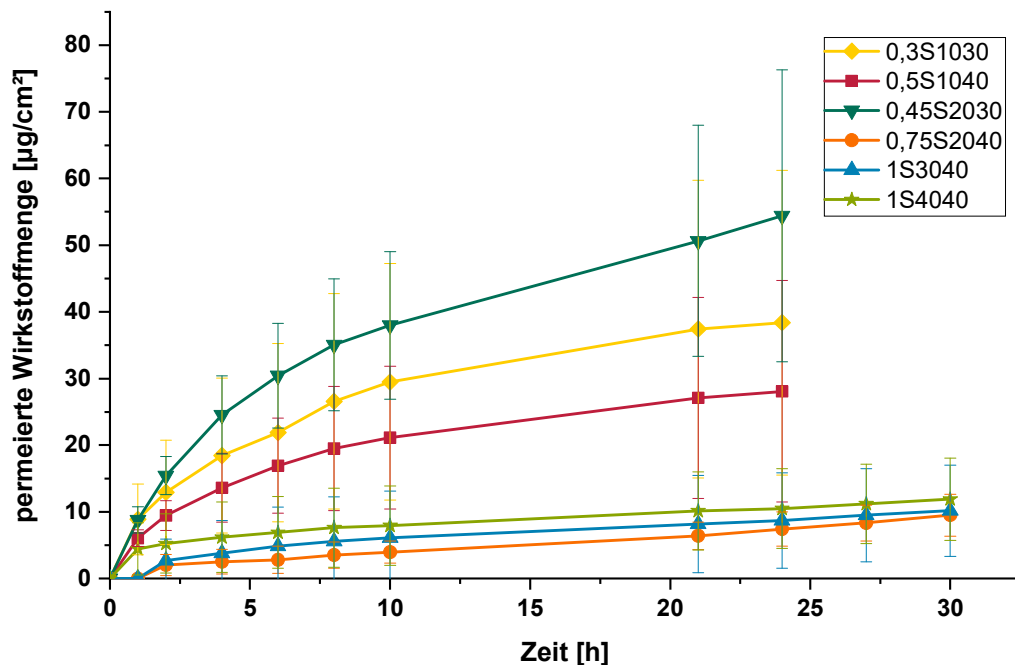


Abbildung 4.17: Permeierte Wirkstoffmenge pro Fläche aus P407-basierten Formulierungen durch SC, Mittelwerte (n=4-8).

Es fällt auf, dass die Formulierungen mit niedrigem Anteil P407/MKT bzw. hohem Wassergehalt die höchsten permeierten Wirkstoffmengen zeigten. Die höhere Wirkstoffmenge in den Formulierungen mit niedrigem Wasseranteil bzw. hohem Gehalt an P407/MKT glich dabei die Unterschiede durch die Zusammensetzung der Formulierung nicht aus. Um die unterschiedliche Wirkstoffkonzentration zu berücksichtigen und nur den Effekt der Formulierung zu bewerten, kann der

Permeationskoeffizient betrachtet werden (Abbildung 4.18). Hier konnten die Formulierungen grob in zwei Gruppen eingeteilt werden: Die Formulierungen 0,75S2040, 1S3040 und 1S4040 mit einem Wassergehalt von 40%, 30% bzw. 20% zeigten einen niedrigen Permeationskoeffizienten, während er bei den Formulierungen 0,3S1030, 0,5S1040 und 0,45S2030 mit Wassergehalten von 50% bis 60% deutlich höher lag. Aufgrund der hohen Standardabweichungen waren die Unterschiede innerhalb der Gruppen nicht signifikant, zwischen den Gruppen zeigte die Formulierung 0,45S2030 eine signifikante Abweichung von den Formulierungen 0,75S2040, 1S3040 und 1S4040.

Es lässt sich also schließen, dass ein Wassergehalt von 50% oder höher die Permeation von SRT durch SC begünstigte. Ein Grund dafür kann in der niedrigviskosen Konsistenz der Formulierungen mit hohen Wassergehalten liegen. In den Formulierungen 1S3040 und 1S4040 mit 30% bzw. 20% Wassergehalt lag die Viskosität deutlich höher als bei den anderen Zusammensetzungen. Dies liegt daran, dass mit steigender P407-Konzentration mehr Mizellen gebildet werden, die miteinander in Wechselwirkung treten. Durch das dichtere Netzwerk von Mizellen werden Mikro-Wasserkanäle in Anzahl und Größe reduziert, sodass die Diffusion des Wirkstoffes reduziert wird (Gilbert et al., 1986). Hinzu kommt, dass sich SRT als lipophiler Arzneistoff vermutlich zu einem relevanten Teil im lipophilen Inneren der Mizellen befindet (Gilbert et al., 1986), was die Freisetzung aus der Formulierung behinderte. In den Formulierungen mit niedrigerem P407-Anteil ist die Mizellinteraktion weniger ausgeprägt, der Wirkstoff kann ungehindert diffundieren und somit auch schneller in das SC eindringen.

Der Unterschied zwischen 0,45S2030 und 0,75S2040 lässt sich allerdings damit nicht begründen, da die Viskosität bei 0,75S2040 sogar etwas niedriger war als bei 0,45S2030. Offensichtlich hatte ein Austausch von IPA/PG durch Wasser einen positiven Effekt, der unabhängig von der Konsistenz der Formulierung war. Dies ließ sich beim Vergleich 0,3S1030 – 0,5S1040 ebenfalls ansatzweise beobachten. Es ist bekannt, dass eine Hydratisierung des SC zu einer Erhöhung der Permeabilität führt (Mojumdar et al., 2017). Vermutlich führt der höhere Wassergehalt zu einer stärkeren Hydratisierung des SC, dieser Effekt überwiegt dem permeationsfördernden Effekt von IPA und PG.

Zu beachten ist, dass ein hoher Wassergehalt sich zwar positiv auf den Permeationskoeffizienten auswirkt, aber gleichzeitig die Löslichkeit des Wirkstoffes begrenzt. Durch die Möglichkeit, mehr Wirkstoff einzuarbeiten, können theoretisch bei niedrigerem Permeationskoeffizienten trotzdem höhere Arzneistofffluxe erzielt werden. Dies war bei den hier untersuchten Formulierungen allerdings nicht der Fall.

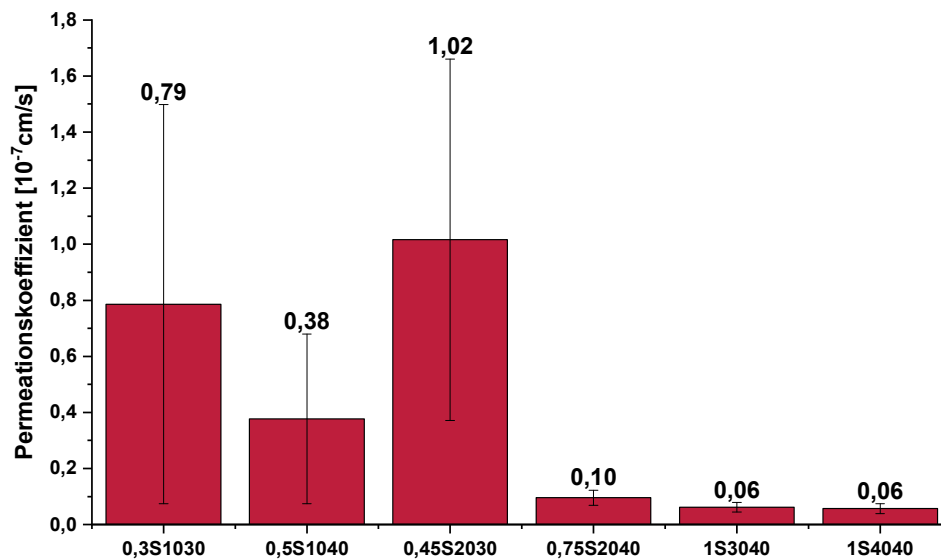


Abbildung 4.18: Permeationskoeffizienten P407-basierter Formulierungen bei der Permeation durch SC, n=4-8.

In Versuchen mit dem Marktprodukt Mykosert® Spray kam es auch bei vorheriger Bestimmung des TEER-Wertes und kurzer Verwendungsfrist des SC zu stark unterschiedlichen Kurvenverläufen. Bei einigen Versuchen war keine Permeation von SRT zu detektieren, bei anderen waren die permeierten Mengen so hoch, dass SRT im Akzeptormedium auskristallisierte. Dies geschah ab frühestens 8 Stunden nach Versuchsbeginn. Aus diesem Grund sind in Abbildung 4.19 nur die Messwerte bis Stunde 6 dargestellt. Die permeierte Menge nach 6 Stunden beträgt zwischen  $0\mu\text{g}/\text{cm}^2$  und  $1291\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . In Tabelle 4.4 sind die zugehörigen Permeationskoeffizienten zwischen Stunde 1 und Stunde 6 aufgeführt. Die Bildung eines Mittelwerts war in Anbetracht der großen Unterschiede nicht sinnvoll.

Diese große Variabilität bei Permeationsuntersuchungen mit Mykosert® Spray ließ keine generelle Aussage über das Permeationsverhalten zu. Variabilitäten zwischen

Hautproben unterschiedlicher Spender sind aus der Literatur bekannt, bei SC-Stücken aus derselben Hautspende ist dies jedoch unerwartet. Offensichtlich werden die SC-Stücke trotz gleicher Behandlung in unterschiedlichem Maße geschädigt. Eine unterschiedliche Beeinflussung des SC bei gleichem Donor ließ sich auch bei der Messung des TEER-Wertes nach Versuchen mit P407-basierten Formulierungen beobachten (siehe Abschnitt 4.2.2.2). Nach Behandlung mit den P407-basierten Formulierungen ergaben sich stark unterschiedliche TEER-Werte, die jedoch keinen direkten Einfluss auf die Permeation von SRT hatten. Trotzdem lässt sich ableiten, dass einzelne SC-Stücke sich unter gleichen Versuchsbedingungen in unterschiedlichem Maße verändern.

Die unterschiedliche Schädigung des SC bei Mykosert® Spray könnte zum Beispiel durch auskristallisierenden Wirk- oder Hilfsstoff passieren, der das SC mechanisch belastet (scharfkantige Kristalle). Auch möglich wäre ein lokal höheres Wirkstoffangebot durch auskristallisierten Wirkstoff. Die Ergebnisse lassen sich nicht direkt auf die Anwendung am Menschen übertragen, inwieweit solche Effekte in vivo auftreten, ist fraglich.

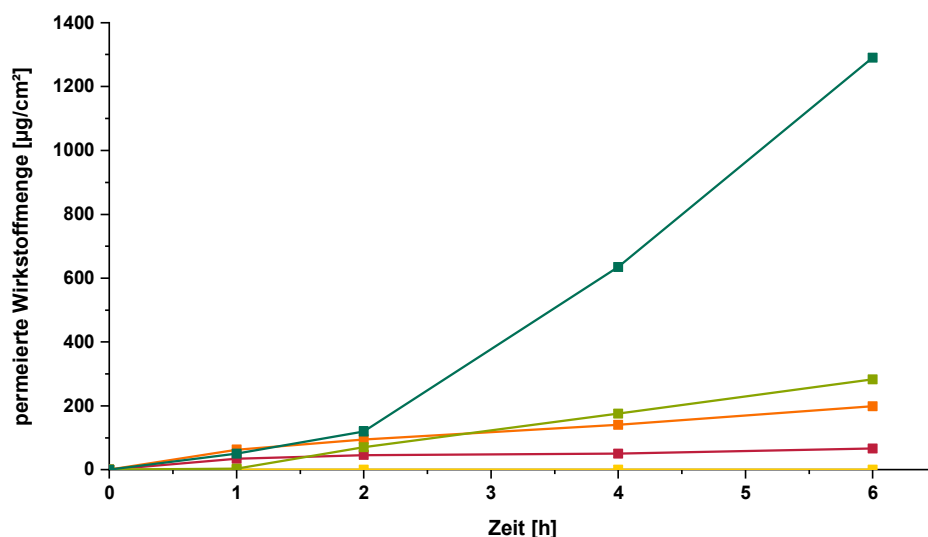


Abbildung 4.19: Permeierte Wirkstoffmenge pro Fläche aus Mykosert® Spray durch SC, Einzelkurven dargestellt bis Stunde 6.

Tabelle 4.4: Permeationskoeffizienten von Mykosert® Spray bei Permeation durch SC, berechnet über die ersten sechs Stunden des Versuchs.

Ansatz Nr.	Permeationskoeffizient [ $10^{-7}$ cm/s]
1	0,81
2	3,68
3	0,00
4	7,68
5	35,42

#### 4.2.3 Permeationsuntersuchungen durch KF

Die Permeationsuntersuchungen durch KF sollten Aufschluss darüber geben, ob die getesteten Formulierungen eine Permeation von SRT durch eine Keratin-Membran ermöglichen. In Abbildung 4.20 sind die durchschnittlichen permeierten Wirkstoffmengen durch KF aus P407-basierten Formulierungen dargestellt.

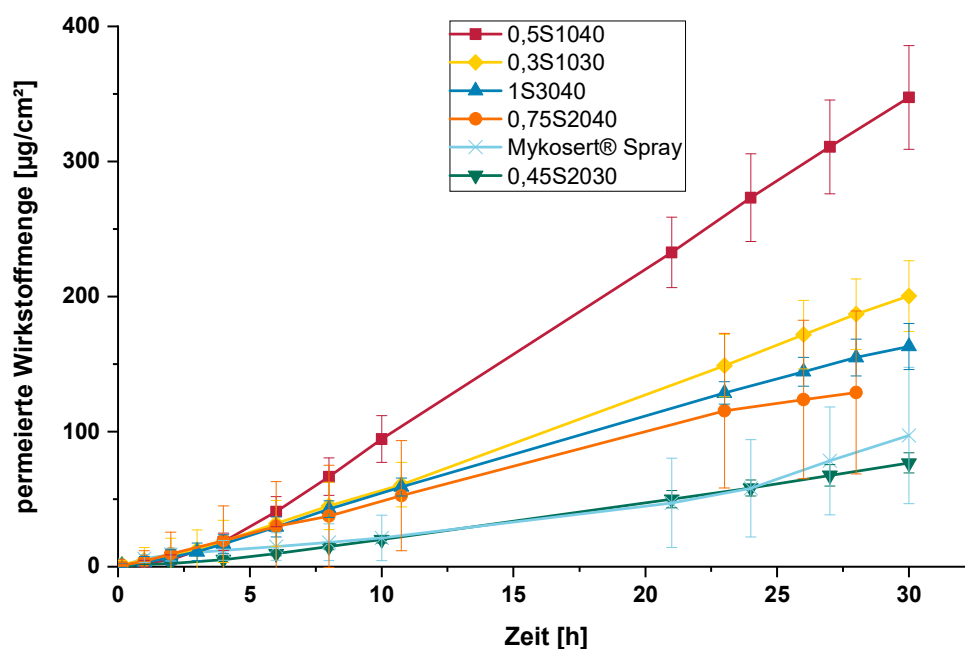


Abbildung 4.20: Permeierte Wirkstoffmenge pro Fläche aus P407-basierten Formulierungen und Mykosert® Spray durch KF, Mittelwerte (n=4-11)

Anmerkung: Bei Formulierung 0,75S2040 wurden fünf Ansätze aus zwei separaten



Versuchsdurchgängen berücksichtigt. Dabei waren die Zeitpunkte der Probenzüge leicht unterschiedlich. Um die Bildung eines Mittelwertes zu ermöglichen, wurden die Zeitpunkte dreier Kurven in der Auswertung durch Interpolation zwischen den benachbarten Zeitpunkten um bis zu zwei Stunden verschoben, sodass sie mit den übrigen beiden übereinstimmten. Der letzte Zeitpunkt wurde vom kürzeren der beiden Versuche übernommen, dieser lag bei 28 Stunden.

Bei allen P407-basierten Formulierungen ging die Kurve nach einer anfänglichen lag-Phase von etwa vier Stunden in einen linearen Verlauf über. Die permeierte Wirkstoffmenge nach 30 Stunden war bei der Formulierung 0,5S1040 mit  $347\mu\text{g}/\text{cm}^2$  am höchsten. Es folgten die Formulierungen 0,3S1030, 1S3040 und 0,75S2040 auf ähnlichem Niveau zwischen  $129\mu\text{g}/\text{cm}^2$  und  $200\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , hier ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen (0,75S2040: Wert bei 28 Stunden berücksichtigt). Die Formulierung 0,45S2030 zeigte mit  $77\mu\text{g}/\text{cm}^2$  die geringste permeierte Wirkstoffmenge nach 30 Stunden.

Mykosert® Spray befand sich mit  $97\mu\text{g}/\text{cm}^2$  in einer ähnlichen Größenordnung wie 0,45S2030. Gegen Ende des Versuchs ab Stunde 24 war eine Erhöhung der Steigung zu beobachten.

Die Permeationskoeffizienten aller Permeationsuntersuchungen durch KF sind in Abbildung 4.21 dargestellt. Die Formulierungen 0,3S1030 und 0,5S1040 lagen hier auf ähnlichem Niveau bei  $6,73 \cdot 10^{-7}\text{cm}/\text{s}$  und  $7,10 \cdot 10^{-7}\text{cm}/\text{s}$ . 0,45S2030, 0,75S2040 und 1S3040 lagen ebenfalls auf ähnlichem Niveau bei  $1,70 \cdot 10^{-7}\text{cm}/\text{s}$ ,  $1,77 \cdot 10^{-7}\text{cm}/\text{s}$  und  $1,57 \cdot 10^{-7}\text{cm}/\text{s}$ . Die höheren Werte bei niedrigeren Anteilen P407/MKT können einerseits mit der niedrigeren Viskosität und damit erleichterter Diffusion des Wirkstoffes begründet werden, wie unter 4.2.4 für SC diskutiert. Andererseits kann der höhere Wasseranteil der beiden Formulierungen eine stärkere Quellung der KF verursachen, was eine erhöhte Permeabilität zur Folge hat. Mykosert® Spray hatte wie erwartet einen geringen Permeationskoeffizienten von  $0,42 \cdot 10^{-7}\text{cm}/\text{s}$ . Aufgrund der höheren Steigung gegen Ende des Versuchs ist denkbar, dass bei Mykosert® Spray eine längere lag-Phase vorlag und der Permeationskoeffizient nach 24 Stunden anstieg. Unter Berücksichtigung der Steigung zwischen Stunde 24 und Stunde 28 läge er bei  $0,90 \cdot 10^{-7}\text{cm}/\text{s}$  und bliebe damit unterhalb der P407-basierten Formulierungen.

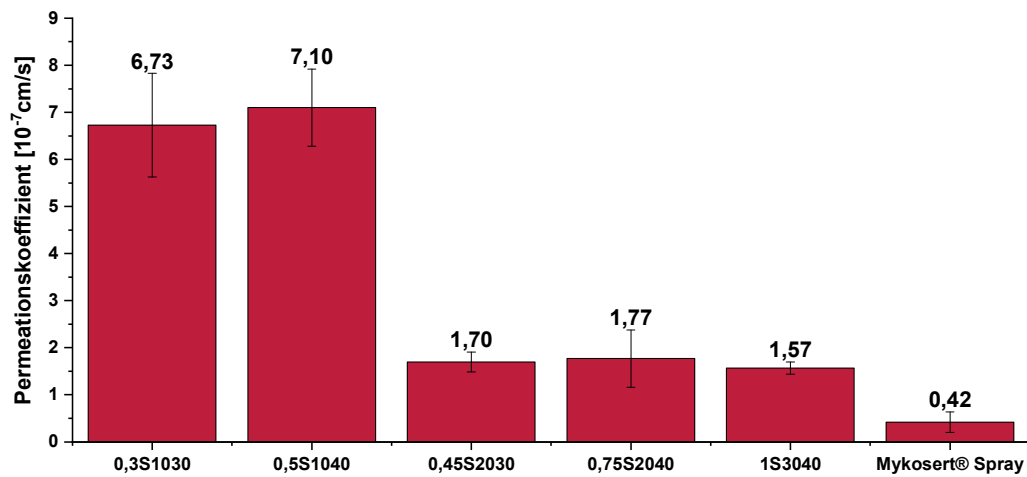


Abbildung 4.21: Permeationskoeffizienten verschiedener Formulierungen bei der Permeation durch KF, n=4-11.

Da der Wirkstoffgehalt in den P407-basierten Formulierungen aufgrund der Sättigungslöslichkeit nicht weiter erhöht werden konnte, ist es auch sinnvoll, den Arzneistoffflux zu betrachten (Abbildung 4.22). Dieser lag bei der P407-basierten Formulierung 0,5S1040 am höchsten, 0,3S1030 lag aufgrund des niedrigen Wirkstoffgehalts nun näher an den Formulierungen mit höherem P407/MKT-Gehalt. Das Ersetzen von Wasser durch IPA/PG hatte keine erkennbare Auswirkung auf den Permeationskoeffizienten. Aufgrund der höheren Löslichkeit von SRT bei höheren Anteilen IPA/PG war beim Arzneistoffflux jedoch ein Unterschied zu erkennen. Die Formulierung 0,5S1040 erreichte beispielsweise einen höheren Flux als die Formulierung 0,3S1030 bei gleichen Permeationskoeffizienten. 0,3S1030 und 0,5S1040 zeigten höhere Fluxe als die anderen Formulierungen, was darauf hindeutet, dass die geringe Löslichkeit von SRT zugunsten der guten Permeation durch den KF toleriert werden kann.

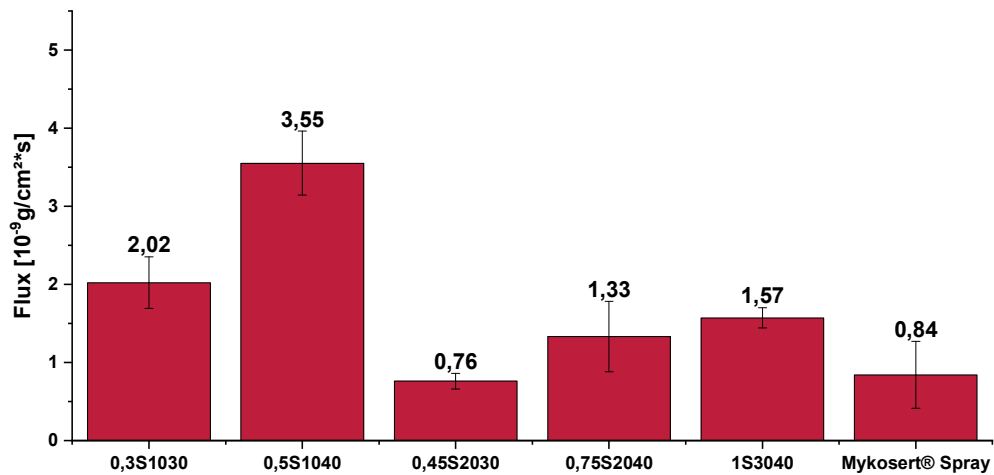


Abbildung 4.22: Arzneistoffflux verschiedener Formulierungen bei der Permeation durch KF, n=4-11.

Die absoluten Werte der Permeation durch KF sind mit Vorsicht zu betrachten, da sie nicht 1:1 auf menschliche Nägel übertragbar sind. Lusiana et al. (2011) beobachteten, dass die Permeation eines lipophilen Stoffes durch KF im Vergleich zu BH als alternatives Nagelmodell begünstigt war, was mit einer erhöhten Affinität des Haarkeratins aufgrund unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzung in Zusammenhang gebracht wurde.

Am Beispiel der Formulierung 0,5S1040 wurde die Variation der Mischungsverhältnisse von P407/MKT bzw. IPA/PG getestet. Die Permeationsdaten von 0,5S1040 (identisch mit 4.19) und den drei untersuchten Variationen sind in Abbildung 4.23 dargestellt. In allen vier Fällen kam es nach einer lag-Phase von etwa vier Stunden zu einem linearen Kurvenverlauf. Dabei schien sich ein hohes Verhältnis von IPA zu PG leicht positiv auf die permeierte Wirkstoffmenge auszuwirken (Verhältnis 2:1 > 1:1 > 1:2), die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Plausibel wäre eine solche Tendenz aufgrund der Verringerung der Viskosität bei Austausch von PG durch IPA. Die Permeationskoeffizienten verhielten sich durch die identische Wirkstoffkonzentration analog, signifikante Unterschiede wurden nicht festgestellt (Abbildung 4.24). Anhand dieser Ergebnisse scheint die Variation der Mischungsverhältnisse keinen entscheidenden Einfluss auf die Permeation von SRT zu haben.

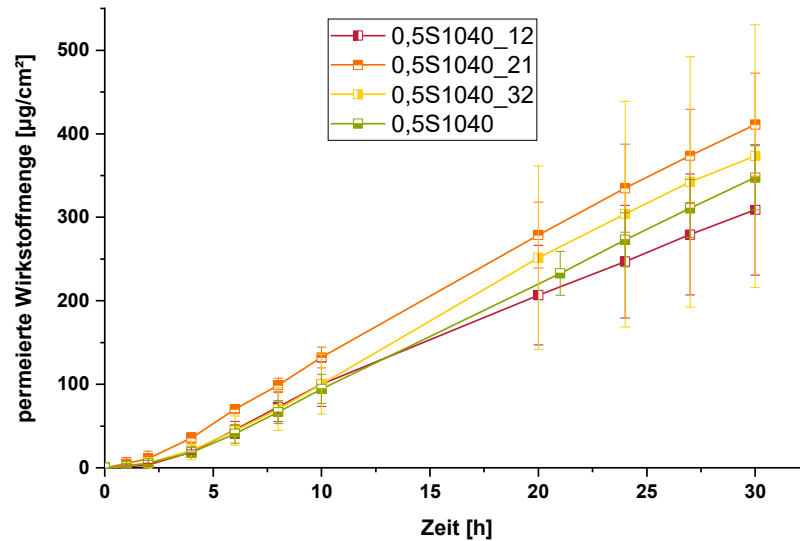


Abbildung 4.23: Permeierte Wirkstoffmenge pro Fläche aus 0,5S01040 und variierten Mischungsverhältnissen durch KF, Mittelwerte (n=3-7).

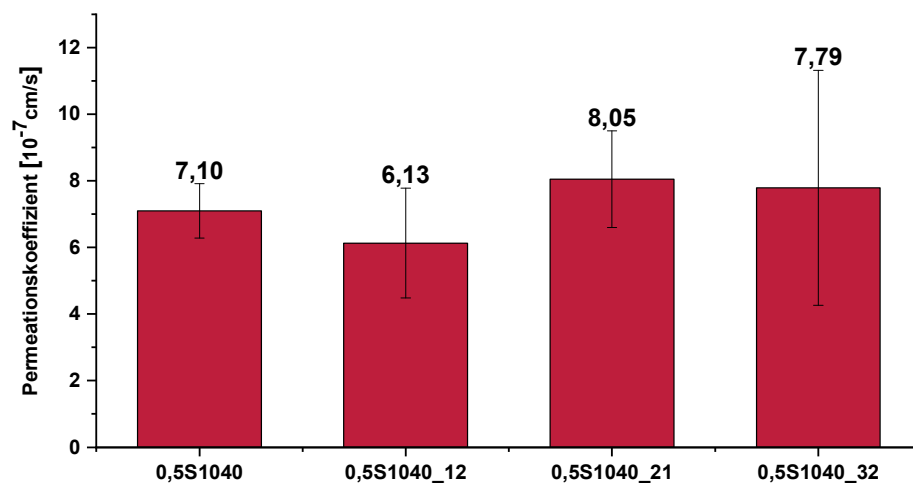


Abbildung 4.24: Permeationskoeffizienten von 0,5S1040 und variierten Mischungsverhältnissen bei der Permeation durch KF, n=3-7.

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Permeationsexperimente wurde der Versuch mit 0,3S1030 unter identischen Bedingungen ein zweites Mal durchgeführt. In Abbildung 4.25 sind die Einzelkurven beider Versuche getrennt dargestellt. Wie in Abbildung 4.26 zu sehen ist, waren die Mittelwerte der beiden Versuche nahezu deckungsgleich. Die nach 30h permeierten Wirkstoffmengen betrugen  $200,3\mu\text{g}/\text{cm}^2$  in Versuch 1 und  $200,7\mu\text{g}/\text{cm}^2$  in Versuch 2 (Standardabweichungen:  $26,2\mu\text{g}/\text{cm}^2$  und

27,8 µg/cm<sup>2</sup>). Als Permeationskoeffizienten ergaben sich  $6,52 \times 10^{-7}$  cm/s in Versuch 1 und  $6,86 \times 10^{-7}$  cm/s in Versuch 2 (Standardabweichungen:  $1,55 \times 10^{-7}$  cm/s und  $0,88 \times 10^{-7}$  cm/s). Es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchen feststellen. Die Permeationsuntersuchungen durch KF erschienen somit gut reproduzierbar.

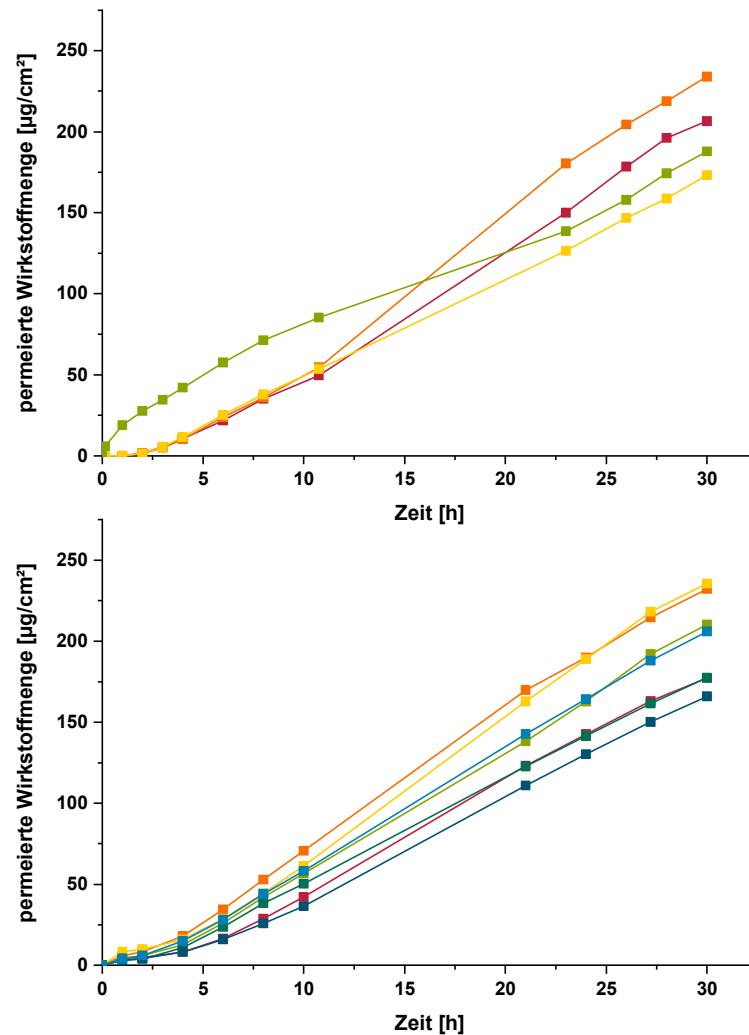


Abbildung 4.25: Permeierte Wirkstoffmenge pro Fläche aus 0,3S1030 durch KF, Einzelkurven aus zwei Versuchen.

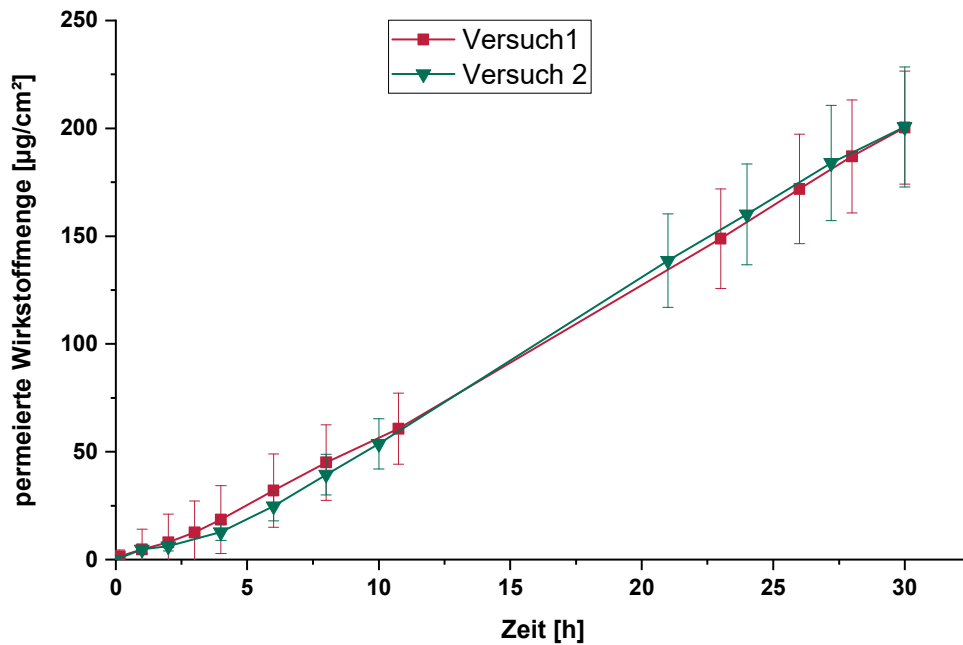


Abbildung 4.26: Permeierte Wirkstoffmenge pro Fläche aus 0,3S1030 durch KF, Mittelwerte Versuch 1 und 2 (n=4, und n=7).

### 4.3 Wirkstoffmenge in Stratum corneum, Keratinfilmn und Nagelschnipseln

#### 4.3.1 Extraktion von SRT aus SC nach Beendigung der Permeationsuntersuchung

Die Extraktion des SC nach Beendigung der Permeation sollte Aufschluss darüber geben, ob die im SC verbleibende Menge SRT sich bei den verschiedenen Formulierungen unterschied. Idealerweise sollten die Formulierungen sowohl die Permeation von SRT durch das SC als auch die Penetration in das SC begünstigen.

Da es sich um Hautpenden von zwei unterschiedlichen Spenderinnen handelte, sind die Ergebnisse der beiden Permeationsserien auch hier getrennt aufgeführt (Tabelle 4.5 und 4.6).

Tabelle 4.5: Extrahierte Menge SRT aus SC nach Beendigung der ersten Serie der Permeationsuntersuchungen, n=2-6.

Formulierung	Menge SRT im SC [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ] ( $\pm$ SD)
0,5S1040	7,41 ( $\pm$ 2,79)
0,75S2040	7,10 ( $\pm$ 2,25)
1S3040	14,05 ( $\pm$ 2,05)
1S4040	13,08 ( $\pm$ 2,44)

Tabelle 4.6: Extrahierte Menge SRT aus SC nach Beendigung der zweiten Serie der Permeationsuntersuchungen, n=4-8. Mit Stern markiert: Formulierungen, bei denen das SC mit PBS gespült wurde.

Formulierung	Menge SRT im SC [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ] ( $\pm$ SD)
0,3S1030	7,63 ( $\pm$ 1,86)
0,5S1040	7,44 ( $\pm$ 2,11)
0,45S2030	4,85 ( $\pm$ 1,87)
0,75S2040*	2,30 ( $\pm$ 1,09)
1S3040*	1,06 ( $\pm$ 0,85)
1S4040	9,35 ( $\pm$ 5,22)
Mykosert® Spray	22,91 ( $\pm$ 12,66)

In der ersten Permeationsserie korrelieren die Mengen im SC nicht mit Permeationskoeffizienten oder Arzneistoffflux: Bei Versuchen mit den Formulierungen 1S3040 und 1S4040 wurden größere Mengen SRT gefunden als bei den Versuchen mit 0,5S1040 und 0,75S2040. Der höhere Wirkstoffgehalt in 1S3040 und 1S4040 wäre eine mögliche Begründung für diese Beobachtung. Die geringen Permeationskoeffizienten bei Versuchen mit den beiden letztgenannten Formulierungen hätten jedoch erwarten lassen, dass auch die Penetration in das SC nicht höher ausfällt als bei 0,5S1040 und 0,75S2040. Als weitere mögliche Erklärung kommt die hohe Viskosität der beiden Formulierungen in Betracht, durch die sie besser am SC haften. Die anhaftenden Reste wurden zwar vorsichtig mit einem Filterpapier

entfernt, gerade bei den hochviskosen Formulierungen waren jedoch wahrscheinlich auch danach noch Rückstände am SC vorhanden.

Bei der zweiten Permeationsserie wurden die SC-Stücke der Versuche mit 0,75S2040 und 1S3040 nach Versuchsende mit PBS gespült und dann mit einem Filterpapier von anhaftender Flüssigkeit befreit. Alle anderen Formulierungen wurden wie zuvor nur mit Filterpapier behandelt.

Die Formulierung 0,5S1040 erreichte mit  $7,44\mu\text{g}/\text{cm}^2$  einen sehr ähnlichen Wert wie in der ersten Permeationsserie, wobei zu beachten ist, dass unterschiedliche Hautspenden nur eingeschränkt vergleichbar sind. Die gefundene Menge SRT bei 0,3S1030 betrug  $7,63\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , beide Formulierungen verhielten sich also sowohl in Bezug auf Permeationskoeffizienten als auch hier ähnlich. Bei der Formulierung 0,45S2030 lag der Wert niedriger, wie auch schon der Permeationskoeffizient in Abschnitt 4.2.2.3.

Bei der Formulierung 1S4040 wurde mit  $9,35\mu\text{g}/\text{cm}^2$  auch in der zweiten Serie ein höherer Wert als bei 0,5S1040 erreicht. Der absolute Wert unterschied sich jedoch von der ersten Permeationsserie und die Standardabweichung lag höher als bei den anderen P407-basierten Formulierungen, was die Vermutung bekräftigt, dass anhaftende Formulierung Grund für die hohe gefundene Menge war.

Weitere Informationen über anhaftende Formulierung gaben die Versuche mit 0,75S2040 und 1S3040, bei denen die SC-Stücke mit PBS gespült wurden. Hier lagen die extrahierten Mengen SRT niedriger als in der ersten Versuchsserie. Dies lässt darauf schließen, dass durch das Spülen mit PBS weitere anhaftende Formulierung entfernt wurde. Fraglich ist, ob dabei auch SRT aus dem SC extrahiert wurde. Da es sich bei PBS um eine wässrige Lösung und kein organisches Lösungsmittel handelt, erscheint eine quantitative Extraktion von SRT jedoch unwahrscheinlich.

Das Verhältnis der Werte bei den beiden Formulierungen war hier umgekehrt, der Wert bei 0,75S2040 lag mit  $2,30\mu\text{g}/\text{cm}^2$  nun höher als bei 1S3040 mit  $1,06\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Diese Umkehrung wäre dadurch möglich, dass bei 1S3040 mehr Formulierung anhaftet, während bei 0,75S2040 mehr SRT im SC vorhanden war.

Der für Mykosert® Spray erhaltene Wert lag deutlich über den Werten der P407-basierten Formulierungen. Die Schwankungen waren wie auch bei der permeierten



Wirkstoffmenge sehr hoch, eine Korrelation zwischen permeierter Menge und Menge im SC konnte jedoch nicht beobachtet werden.

#### 4.3.2 Extraktion von SRT aus KF nach Beendigung der Permeationsuntersuchung

Die extrahierten Mengen aus KF sind in Tabelle 4.7 dargestellt. Die Menge nach Behandlung mit P407-basierten Formulierungen korrelierte dabei mit dem Arzneistoffflux (siehe Abschnitt 4.2.3). Wie beim Flux lag der Wert bei Formulierung 0,5S1040 ( $52,5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) höher als bei 0,3S1030 ( $33,4\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Ein Austausch von Wasser durch IPA/PG hatte also einen positiven Effekt auf die im KF gefundene Menge SRT, was auch im Vergleich 0,45S2030 – 0,75S2040 deutlich wird. Bei Erhöhung des Anteils P407/MKT nahm die Menge im KF zunächst von 0,5S1040 nach 0,75S2040 ab, bei weiterer Erhöhung von 0,75S2040 zu 1S3040 war kein signifikanter Einfluss mehr zu erkennen. Die extrahierte Menge bei Mykosert® Spray lag mit  $42,1\mu\text{g}/\text{cm}^2$  zwischen 0,3S1030 und 0,5S1040, hier war der Wert also höher, als der Arzneistoffflux erwarten lässt. SRT kann aus Mykosert® Spray in den KF penetrieren, ihn jedoch in geringerem Maße durchdringen als aus P407-basierten Formulierungen. Da Mykosert® Spray eine wasserfreie Formulierung ist, kann der KF nicht quellen, was die Permeation behindert. Zu vermuten ist, dass von der Donorseite aus SRT in den KF diffundierte, was durch die hohe Wirkstoffkonzentration und die Vorquellung des KF möglich war. Für eine hohe Permeation von SRT war die Vorquellung jedoch nicht ausreichend.

Tabelle 4.7: extrahierte Menge SRT aus KF nach Beendigung der Permeationsuntersuchungen, n=4-11.

Formulierung	Menge SRT im KF [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ] ( $\pm$ SD)
0,3S1030	33,4 ( $\pm$ 16,6)
0,5S1040	52,2 ( $\pm$ 17,1)
0,45S2030	12,7 ( $\pm$ 1,8)
0,75S2040	24,1 ( $\pm$ 7,8)
1S3040	24,9 ( $\pm$ 8,6)
Mykosert® Spray	42,1 ( $\pm$ 5,6)

### 4.3.3 Extraktion von Nagelmodellen und NS nach Inkubation mit SRT-haltigen Formulierungen

Da Permeationsuntersuchungen mit menschlichen Nägeln nur unter großem Aufwand durchführbar sind, ein Vergleich jedoch interessant für die Übertragbarkeit von Nagelmodellen auf menschliche Nägel war, wurden NS und Nagelmodelle mit SRT-haltigen Formulierungen inkubiert und anschließend extrahiert. In Abbildung 4.27 ist die extrahierte Wirkstoffmenge in Bezug auf die Masse der KF / BH / NS dargestellt. Es zeigte sich, dass in den KF mit etwa 0,6% die größte Menge SRT zu finden war, aus BH wurde nur etwa halb so viel extrahiert. In den NS wurde wiederum knapp halb so viel Wirkstoff gefunden wie in den BH. Aus Untersuchungen von Mertin und Lippold (1997) ist bekannt, dass die Permeabilität menschlicher Nägel generell geringer ist als die von Hufkeratin (Mertin und Lippold, 1997a). Dies wurde mit einer dichteren Struktur des Keratins bei menschlichen Nägeln begründet, was die Diffusion insbesondere größerer Moleküle durch engere und gewundenere Poren im Gelgerüst behindert. Dies kann auch die hier gefundenen Ergebnisse erklären.

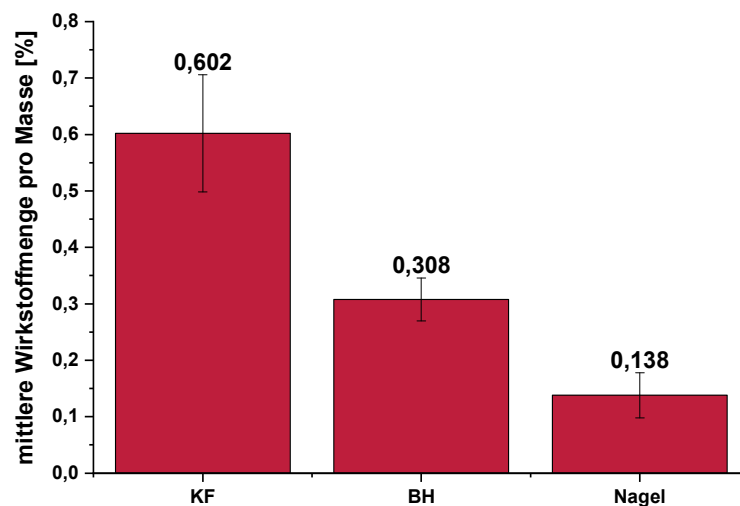


Abbildung 4.27: Extrahierte Wirkstoffmenge bezogen auf die Masse aus KF, BH und NS nach 30 Stunden Inkubation mit 0,75S2040, n=3.

Allerdings sollte auch berücksichtigt werden, dass die Oberfläche der NS und der KF bzw. BH unterschiedlich war und somit auch nicht die gleiche Gesamtfläche zur Wechselwirkung mit der Formulierung zur Verfügung stand. Bei KF und BH wurden

wie bei den Permeationen Ausstanzungen mit einem Durchmesser von 1,5cm und einer Dicke von 120µm verwendet, die NS waren dagegen annähernd sichelförmig. Eine bessere Vergleichbarkeit könnte durch Berücksichtigung der Oberfläche erzielt werden, wobei diese für die NS nur wie in Abschnitt 3.2.11 beschrieben abgeschätzt werden konnte. Die abgeschätzte massenspezifische Oberfläche der NS lag im Mittel von fünf repräsentativen Proben bei 39,5cm<sup>2</sup>/g (Standardabweichung 6,0cm<sup>2</sup>/g). Mit diesem Wert wurde die Oberfläche der hier verwendeten NS über deren Masse abgeschätzt. In Abbildung 4.28 ist die extrahierte Wirkstoffmenge bezogen auf die abgeschätzte Fläche dargestellt. Der Unterschied zwischen KF und BH war hier noch deutlicher als bei den massenbezogenen Werten. Die flächenbezogene Wirkstoffmenge in NS lag zwischen KF und BH. Dies zeigt, dass eine Betrachtung beider Modelle sinnvoll ist, da die Wirkstoffmenge je nach Modell über- oder auch unterschätzt werden kann. Es bleibt aber zu beachten, dass das Verhältnis Oberfläche zu Volumen bei NS und KF / BH sich unterschied, was einen Einfluss auf die flächenbezogene Wirkstoffmenge haben kann.

Für KF wurde zusätzlich die extrahierte Wirkstoffmenge nach Permeation aus Abschnitt 4.3.2 dargestellt. Dabei ist zu beachten, dass die Fläche, die mit der Formulierung in Kontakt war, sich unterschied: Bei der Inkubation in der Formulierung war die gesamte Oberfläche der KF mit Formulierung bedeckt (Gesamtfläche Ober- und Unterseite etwa 3,5cm<sup>2</sup>), während bei den Permeationsuntersuchungen nur an der Öffnung des Donorkompartiments Kontakt zur Formulierung bestand. Diese Fläche betrug im Durchschnitt etwa 0,5cm<sup>2</sup> und wurde hier für die Berechnung verwendet. Es zeigte sich, dass die Wirkstoffmenge in Bezug auf die Kontaktfläche nach Permeation höher war als nach 30h Inkubation von KF in der Formulierung. In Bezug auf die Gesamtfläche wäre der Wert nach Permeation dagegen geringer. Dies spricht dafür, dass die KF nach Permeationsende nicht mit Wirkstoff gesättigt waren. Eine höhere Kontaktfläche führt zu höheren SRT-Mengen in den KF. Linear ist dieser Zusammenhang jedoch nicht, da der Wirkstoff bei Kontakt mit nur einem Teil der Oberfläche auch lateral im KF diffundieren kann, wodurch die extrahierte Menge in Bezug auf die Kontaktfläche steigt.

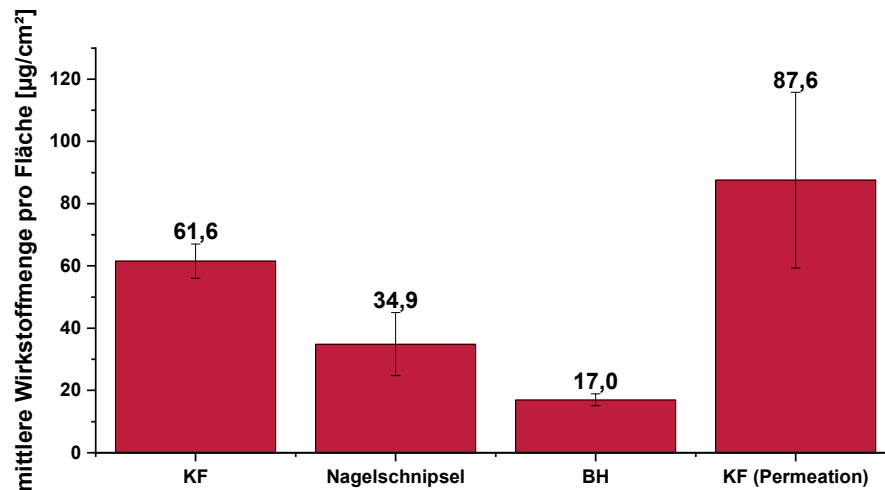


Abbildung 4.28: Extrahierte Wirkstoffmenge aus KF und NS bezogen auf die exponierte Fläche nach 30 Stunden Inkubation mit 0,75S2040, n=3. Rechts: Vergleich zur extrahierten Wirkstoffmenge nach Permeation mit 0,75S2040, n=5.

## 4.4 Hemmung des Pilzwachstums von *T. rubrum* in in vitro-Infektionsmodellen

### 4.4.1 Infiziertes Nagelmodell

Im infizierten Nagelmodell wurde untersucht, ob die getesteten Formulierungen das Wachstum von *Trichophyton rubrum*, dem Haupterreger der Onychomykose, hemmen konnten. Nach sechs Tagen Inkubation der infizierten BH bzw. KF wurden Scores zwischen vollständiger Hemmung des Pilzwachstums (Score 0) und einem vollständigen Pilzbefall am Rand der KF bzw. BH (Score 10) beobachtet (Tabelle 4.8). Im BH-Modell wurde der niedrigste Score mit der Formulierung 0,5S1040 bei voller Pilzwachstumshemmung in allen Versuchen erreicht (n=7). Andere P407-basierte Formulierungen erreichten ein partielles Pilzwachstum mit einem durchschnittlichen Score zwischen 0,6 und 4,38. Hier bestätigt sich die Beobachtung aus den Permeationsuntersuchungen, dass ein hoher Wasseranteil notwendig war, um die Permeation von SRT durch die Nagelmodelle zu ermöglichen. Die Formulierung 1S4040 konnte das Pilzwachstum trotz höherem Wirkstoffgehalt im Vergleich zu 0,5S1040 nicht vollständig hemmen. Der Wasseranteil ist in diesem Vergleich somit relevanter als der Wirkstoffanteil. Die Formulierung 0,3S1030 zeigte jedoch den

höchsten Score von 4,38. Hier war die applizierte Gesamtmenge an Wirkstoff offensichtlich nicht mehr ausreichend, um das Wachstum von *T. rubrum* zu hemmen.

Das für die Hautpilzbehandlung zugelassene Mykosert®-Spray zeigte die geringste Wachstumshemmung mit einem Durchschnittswert von 7,67. Im KF-Modell waren die Werte im Allgemeinen höher als im BH-Modell, alle P407-basierten Formulierungen zeigten eine partielle Wachstumshemmung mit Durchschnittswerten zwischen 2,5 und 9.

Tabelle 4.8: Ergebnisse des infizierten Nagelmodells mit BH und KF nach 6 Tagen Inkubation.

\*Mann-Whitney-U-Test, zweiseitig;  $S_0$ : arithmetrischer Mittelwert; SD: Standardabweichung

Formu- lierung	BH					KF					p*
	n	Scores	$S_0$	SD	Median	n	Scores	$S_0$	SD	Median	
Blind	10	10; 10; 10; 10; 10; 10; 10; 10; 10; 10	10	0	10	6	10; 10; 10; 10; 10; 10	10	0	10	1
0,3S1030	8	2; 3; 4; 4; 4; 4; 6; 8	4,38	1,85	4	4	8; 8; 10; 10	9	1,15	9	0,008
0,5S1040	7	0; 0; 0; 0; 0; 0; 0	0	0	0	6	0; 2; 2; 3; 4; 8	3,17	2,71	2,5	0,008
0,45S2030	-	-	-	-	-	4	6; 8; 8; 10	8	1,63	8	-
0,5S2030	10	0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 1; 5	0,6	1,58	0	-	-	-	-	-	-
0,75S2040	8	0; 0,5; 1; 1; 1; 3; 3; 3	1,56	1,24	1	4	2; 3; 3; 5	3,25	1,26	3	0,109
0,8S2040	4	0; 0; 0; 0	0	0	0	-	-	-	-	-	-
1S3040	6	0; 0; 0; 0,5; 1; 3	0,75	1,17	0,25	4	1; 1; 3; 5	2,5	1,91	2	0,067
1S4040	8	0; 1; 2,5; 3; 3; 3; 4; 5	2,69	1,58	3	4	0; 2; 3; 6	2,75	2,5	2,5	0,933
Mykosert® Spray	9	2; 4; 5; 9; 9; 10; 10; 10; 10	7,67	3,12	9	4	9; 9; 9; 9	9	0	9	0,825

Gemäß dem Mann-Whitney-U-Test gab es einen signifikanten Unterschied zwischen KF und BH bei den Formulierungen 0,3S1030 und 0,5S1040 ( $p=0,008$  in beiden Fällen). Solche Unterschiede wurden in früheren Studien nur einmal gefunden, als Lamisil®-Creme mit beiden Modellen getestet wurde (Täuber und Müller-Goymann, 2016). In den letztgenannten Studien wurde jedoch in der Regel entweder ein vollständiges Wachstum (Score 10) oder eine vollständige Hemmung (Score 0) beobachtet. Da es sich um die höchst- und niedrigstmöglichen Scores handelt, können die Unterschiede zwischen KF und BH in diesen Fällen maskiert sein. In der

vorliegenden Studie wurden auch Scores zwischen 0 und 10 beobachtet, sodass Unterschiede zwischen BH und KF leichter zu erkennen waren.

Ein wichtiger Unterschied zwischen BH und KF, der ein Grund für die unterschiedlichen Werte sein kann, ist ihre Fähigkeit, Wasser zu absorbieren. BH können 45% Wassers relativ zu ihrem Trockengewicht aufnehmen, während KF nur bis zu 5% aufnehmen (Lusiana et al., 2011). Es hat sich gezeigt, dass die Hydratisierung der menschlichen Nagelplatte die Permeabilität für Ketoconazol erhöht, wahrscheinlich aufgrund einer höheren Flexibilität der Keratinmatrix in einem hydratisierten Zustand (Gunt und Kasting, 2007). Der Wassergehalt der Formulierungen hat daher einen Einfluss auf die Hemmung des Pilzwachstums. Wenn BH mehr Wasser aufnehmen als KF, ist zu erwarten, dass der maximale Effekt der Quellung bei BH stärker ist. Dies würde bessere Ergebnisse im BH-Modell bei wasserhaltigen Formulierungen erklären.

Die Formulierungen 0,3S1030 und 0,5S1040 hatten die höchsten Wassergehalte von 60% bzw. 50%, dort ist dieser Effekt also am relevantesten und es konnten signifikante Unterschiede beobachtet werden. Ein Vergleich mit menschlichen Nagelplatten wäre interessant, um herauszufinden, welches der Modelle ihnen ähnlicher ist. Da die maximale Wasseraufnahme menschlicher Nägel mit bis zu 30% zwischen BH und KF liegt (Lusiana et al., 2011), schien die Verwendung beider Modelle vorerst sinnvoll zu sein.

Mykosert® Spray hatte in den Experimenten mit KF einen durchschnittlichen Wert von 9. Die hohen Werte der Referenz zeigen, dass eine für die Anwendung auf der Haut optimierte Zusammensetzung für die Behandlung von Pilzinfektionen des Nagels nicht geeignet ist. Die starke Wachstumshemmung von 0,5S1040 trotz des geringen Wirkstoffgehalts lässt sich durch den bereits erwähnten hohen Wassergehalt des Vehikels erklären, der zu einer Hydratisierung der Nagelmodelle und damit zu einer erhöhten Penetration von SRT führte. Der hohe Wasser- und der niedrige P407-Gehalt dürften auch einen Einfluss auf die Wirkstofffreisetzung aus dem Vehikel haben: Bei höherem P407-Gehalt werden mehr Mizellen gebildet, die miteinander interagieren und ein Netzwerk bilden. Bei einem dichteren Netzwerk von Mizellen werden die wässrigen Mikrokanäle kleiner und die Diffusion des Wirkstoffs wird erschwert (Gilbert et al., 1986). Ein zweiter Faktor ist die Lokalisation von SRT innerhalb der Emulsion:

Aufgrund seiner hohen Lipophilie ist es wahrscheinlich, dass SRT in einem relevanten Ausmaß innerhalb der Mizellen lokalisiert ist (Gilbert et al., 1986). Bei einem höheren Gehalt an P407 / MKT sind die Mizellen dichter gepackt, was die Diffusion aus dem Mizellinneren behindert.

Die Experimente mit 0,8S2040 mit BH wurden durchgeführt, bevor eine Rekristallisation von SRT beobachtet wurde und dadurch eine Reduktion des gelösten SRT-Gehalts stattfand. Folglich wurden die Experimente mit der stabilen Zusammensetzung 0,75S2040 hinzugefügt. Auch die Formulierung 0,5S2030 wurde in Versuchen mit BH verwendet, bevor der Gehalt aufgrund zuvoriger Rekristallisation auf 0,45% gesenkt wurde. In den Experimenten mit KF wurde dann die resultierende Formulierung 0,45S2030 verwendet. In diesen beiden Beispielen ist zu beobachten, dass die zusätzlichen 0,05 Prozentpunkte SRT zu einem wesentlich besseren Ergebnis führen. Eine übersättigte Lösung scheint für das Eindringen von SRT in das Nagelplattenmodell von Vorteil zu sein. Dies impliziert, dass es wünschenswert ist, eine solche übersättigte Lösung am Ort der Anwendung zu schaffen, z.B. durch Verdunstung von flüchtigen Verbindungen, um eine höhere Nagelpenetration und Permeation zu erreichen.

#### **4.4.2 Infiziertes SC-Modell**

Das infizierte SC-Modell sollte zeigen, ob die Formulierungen, die im infizierten Nagelmodell gute Ergebnisse erzielten, auch das Pilzwachstum im SC hemmen konnten. Die Ergebnisse des Versuchs sind in Tabelle 4.9 zusammengefasst. Bei den Blindversuchen lag der Score dabei wie erwartet bei 10, was einen vollständigen Befall des SC-Randes mit Pilzkolonien bedeutete. Die Scores der P407-basierten Formulierungen lagen im Mittel zwischen 0,6 und 3,66, das Wachstum von *T. rubrum* wurde also partiell gehemmt. Signifikante Unterschiede zwischen den Formulierungen ließen sich nicht feststellen. Wie auch bei den Permeationsuntersuchungen waren die Abweichungen zwischen einzelnen SC-Stücken relativ hoch, bei Formulierung 0,5S1040 wurde z.B. zweimal eine vollständige Hemmung des Pilzwachstums beobachtet (Score 0), während in einem anderen Fall ein Score von 10 vergeben wurde. Bei BH und KF fielen solche Schwankungen schwächer aus.

Als Vergleich mit einem Marktprodukt zur Anwendung auf der Haut wurde der Versuch mit Mykosert® Spray durchgeführt. Hier ergab sich ebenfalls eine partielle Wachstumshemmung mit einem Score von 8,6. Dieser Wert zeigt, dass auch bei einem Präparat mit nachgewiesener Wirksamkeit in diesem Versuch keine vollständige Hemmung des Pilzwachstums erzielt wird. Die hier gefundene partielle Hemmung reicht in vivo offensichtlich aus, um über die Dauer der Behandlung die Infektion zu bekämpfen. Für die Formulierungen, die hier einen niedrigeren Score als Mykosert® Spray gezeigt haben, ist also eine noch bessere Wirksamkeit in vivo zu erhoffen.

Es bleibt aber zu bedenken, dass die Art der Anwendung im Modell sich von der in vivo unterscheidet. In drei der fünf Versuche mit Mykosert® Spray kristallisierte SRT während der Inkubation über dem SC aus, wodurch der Wirkstoff nicht mehr zur Diffusion in das SC zur Verfügung stand. Dies geschah durch Verdampfen des Lösemittels, obwohl der Ring mit der Formulierung mit einer PET-Folie bedeckt war. Die flüssigen Bestandteile diffundierten also entweder durch das SC und ggf. in den Agar oder entwichen durch kleinste Öffnungen. Bei den P407-basierten Formulierungen wurde dies nicht beobachtet, vermutlich aufgrund des niedrigeren Dampfdrucks von Wasser und PG im Vergleich zum in Mykosert® Spray enthaltenen Ethanol. Da die Formulierung in vivo zweimal täglich angewendet wird, steht hier immer wieder gelöster Wirkstoff zur Verfügung, was vermutlich in einer höheren Wirkstoffkonzentration im SC resultiert.

Tabelle 4.9: Ergebnisse des SC-Modells nach 6 Tagen Inkubation.  $S_0$ : arithmetischer Mittelwert; SD: Standardabweichung

Formulierung	Score	$S_0$	SD	Median
Blind	10; 10; 10; 10; 10; 10	10	0	10
Ciclopoli®	0; 0	0	0	0
0,3S1030	1; 0; 0; 0; 2	0,6	0,89	0
0,5S1040	0; 2; 6; 4; 10; 0	3,67	3,88	3
0,45S2030	0; 0; 5; 5; 3; 5	3	2,45	4
0,75S2040	4; 4; 0; 3; 2	2,6	1,67	3
1S3040	2; 0; 0; 0; 1	0,6	0,89	0
1S4040	5; 0; 2; 4	2,75	2,22	3
Mykosert® Spray	10; 6; 10; 7; 10	8,6	1,95	10



## 4.5 Rheologische Charakterisierung der Formulierungen

### 4.5.1 Fließverhalten und dynamische Viskosität

Zur Bestimmung des Fließverhaltens und der dynamischen Viskosität wurden Fließkurven bei unterschiedlichen Temperaturen aufgenommen. Die drei verwendeten Temperaturen, 4°C, 20°C und 32°C, sollten Kühlschranktemperatur, Raumtemperatur und die Oberflächentemperatur der Haut abbilden. Dabei war vor allem interessant, inwiefern sich Viskosität und Fließverhalten änderten, wenn die Formulierungen auf 32°C erwärmt wurden, da dies Aufschluss über das Verhalten auf der Haut gab.

In Abbildung 4.29 ist beispielhaft ein Rheogramm der Formulierung 0,75S2040 bei 20°C dargestellt. Das Schergefälle stieg linear mit der Schubspannung, Hin- und Rückkurve waren deckungsgleich. Demnach lag ein idealviskoses Fließverhalten vor. Alle Formulierungen mit 20% P407/MKT oder weniger zeigten dieses Verhalten.

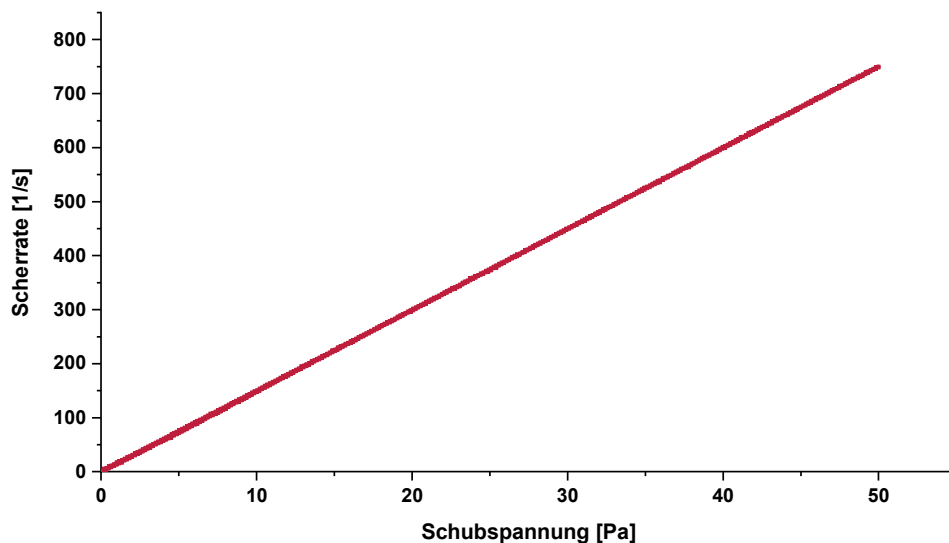


Abbildung 4.29: Rheogramm von 0,75S2040 bei 20°C (Hin- und Rückweg deckungsgleich).

Bei Formulierungen mit 30% P407/MKT und mehr waren Fließgrenzen zu erkennen, die bei geringen Schubspannungen zwischen etwa 3,5 Pascal und 15 Pascal lagen (Abbildung 4.30). Hier kam es also zur Ausbildung eines Gelgerüsts von P407-Mizellen, das die Fließgrenze bedingte. Die Gelierung war vermutlich auch durch eine Verdunstung von IPA am Rand der Messgeometrie beeinflusst, durch die es zur

Bildung eines halbfesten Films an der Oberfläche kam. Dieses Phänomen konnte auch durch den Einsatz einer Lösemittelfalle nicht ganz ausgeschlossen werden. Die Hysteresefläche bei Vorhandensein einer Fließgrenze ließ auf eine Rheodestruktion der Gelstruktur schließen.

Einarbeitung von SRT verschob die Fließgrenze zu geringeren Schubspannungen oder ließ sie ganz verschwinden. Der Aufbau des Gelgerüsts wurde also durch die Einarbeitung von SRT gestört. Da es sich um einen lipophilen Wirkstoff handelt, ist eine Interaktion mit den lipophileren Polyoxypropylenblöcken des Poloxamers wahrscheinlich. Lusiana (2012) machte ähnliche Beobachtungen mit dem Wirkstoff Terbinafin und vermutete, dass dadurch die für die Gelierung notwendige Dehydratation des Poloxamers behindert wurde.

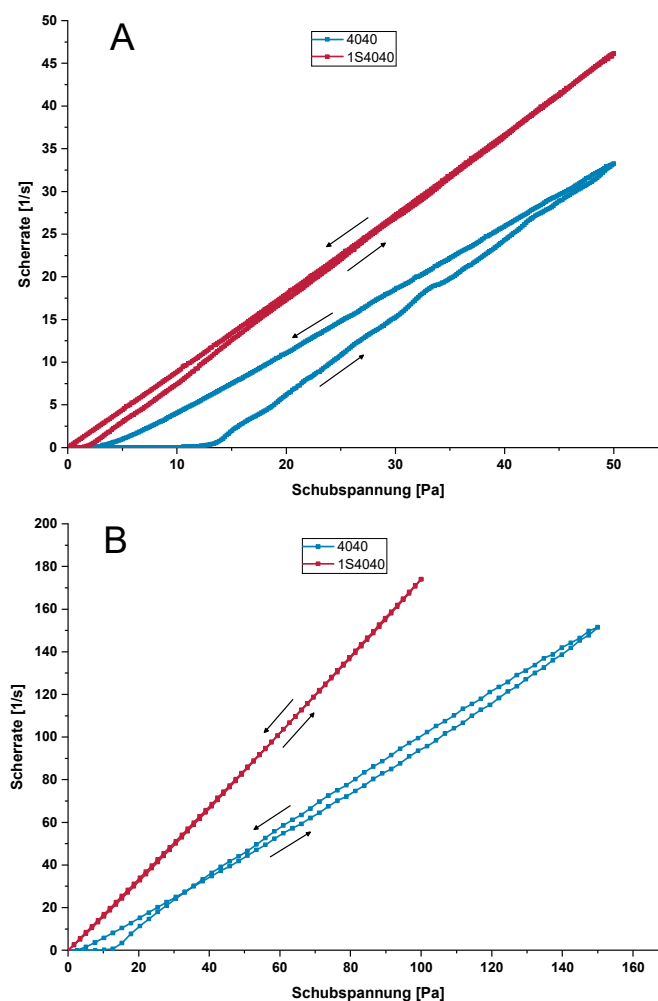


Abbildung 4.30: Rheogramme von 4040 und 1S4040 bei 20°C (A) und 32°C (B).

In Abbildung 4.31 ist die dynamische Viskosität der wirkstofffreien Formulierungen bei den drei unterschiedlichen Temperaturen aufgeführt. Es zeigte sich, dass die Viskosität bei steigender Temperatur abnahm, wie es für idealviskose Flüssigkeiten zu erwarten ist. Eine Erhöhung durch eine mögliche Thermogelierung konnte nicht beobachtet werden. Allerdings fiel die Änderung der Viskositäten unterschiedlich aus. Insbesondere war das bei der Formulierung 2030 der Fall, bei der die Abnahme der Viskosität deutlich geringer war als bei den anderen Zusammensetzungen. Bei der Formulierung 2040 sank die Viskosität zwischen 4°C und 32°C um 61,4%, bei 2030 sind es dagegen nur 12,8%. Die Formulierung 2030 befindet sich im Mischungs-dreieck relativ nahe an der Thermogel-Rezeptur (2525), die ein ausgeprägtes Thermogelieverhalten im vermessenen Temperaturbereich zeigte. Es ist denkbar, dass sich bei der Formulierung 2030 beide Effekte annähernd ausglich: Einerseits eine vermehrte Assoziation von Mizellen, die beim Thermogel zur Thermogelierung führt, andererseits die erniedrigte Interaktion der Lösemittel-Moleküle durch deren höhere kinetische Energie.

Ein Vergleich der Formulierungen bei gleicher Temperatur erlaubte es, den Einfluss der unterschiedlichen Bestandteile auf die Viskosität zu betrachten. Ein Austausch von Wasser durch P407/MKT erhöhte erwartungsgemäß die Viskosität. Der Austausch von Wasser durch IPA/PG erniedrigte die Viskosität im Vergleich der Formulierungen 2030 und 2040, während sie sich bei den Formulierungen mit 10% P407/MKT nur geringfügig änderte. Wie unter 4.5.1 diskutiert, wurde die Verringerung der Viskosität vermutlich durch eine Verringerung der Mizellassoziation von P407 verursacht. Da in den Formulierungen mit 10% P407/MKT die Anzahl Mizellen von vornherein gering ist, war der Effekt hier nicht ausgeprägt.

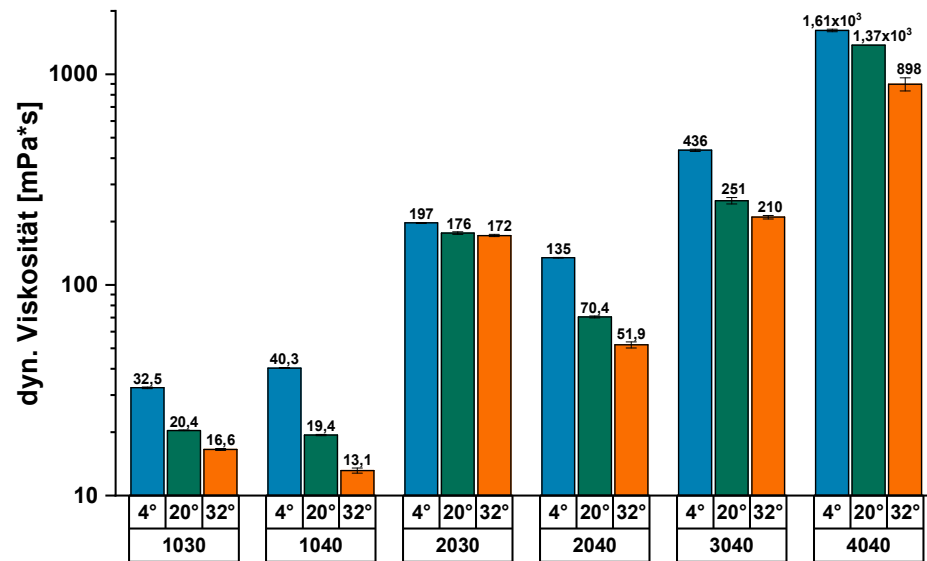


Abbildung 4.31: Dynamische Viskosität wirkstofffreier Formulierungen bei 4°C, 20°C und 32°C. n=3, 4040 20°C n=1.

Die wirkstoffhaltigen Systeme verhielten sich ähnlich wie die wirkstofffreien (Abbildung 4.32). Im direkten Vergleich bei 20°C (Abbildung 4.33) war erkennbar, dass die Viskosität durch die Einarbeitung von SRT leicht sank, sofern die P407-Konzentration  $\geq 16\%$  erreichte. Wie schon die Verringerung der Fließgrenze kann dieser Effekt mit einer Interaktion des Wirkstoffs mit den P407-Molekülen erklärt werden, durch die die Bildung von Mizellen behindert wird.

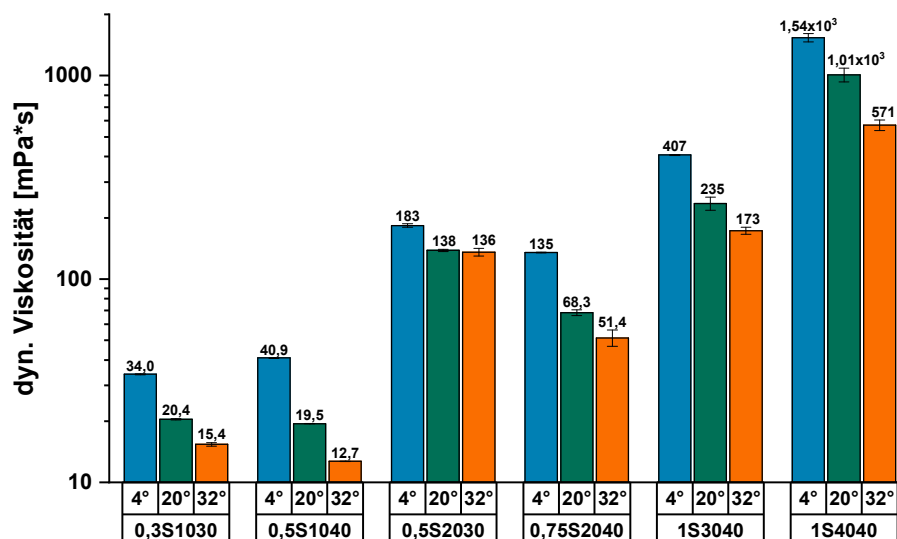


Abbildung 4.32: Dynamische Viskosität wirkstoffhaltiger Formulierungen bei 4°C, 20°C und 32°C, n=3.

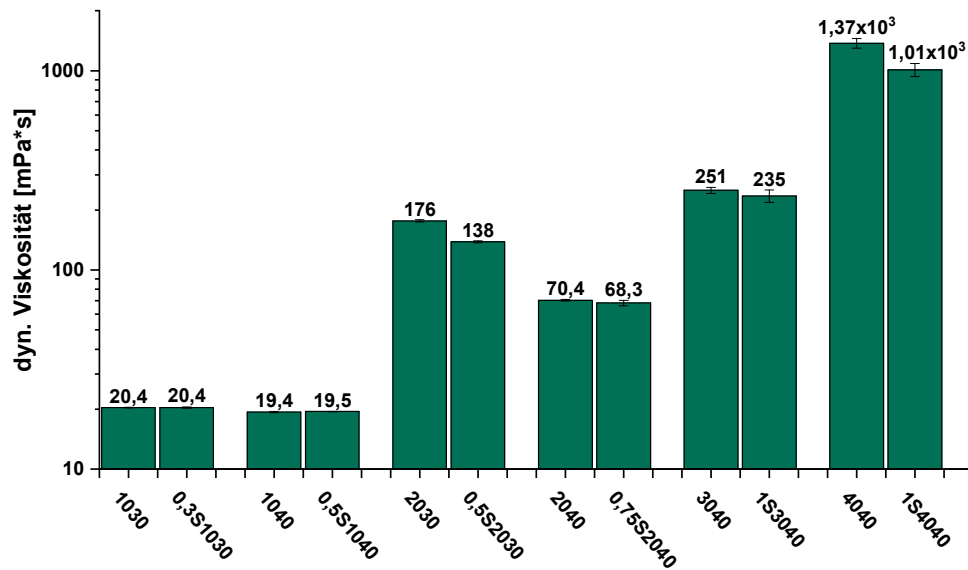


Abbildung 4.33: Dynamische Viskosität bei 20°C – Vergleich wirkstofffreier und wirkstoffhaltiger Formulierungen.

Bei 20°C wurde zusätzlich die Variation der Mischungsverhältnisse IPA/PG und P407/MKT getestet (Abbildung 4.34). Dies geschah am Beispiel der Formulierungen 2030 und 3040. Bei Variation des Verhältnisses IPA/PG von 1:1 nach 1:2 erhöhte sich die Viskosität in beiden Fällen, bei 2030 von 168mPa\*s auf 422mPa\*s und bei 3040 von 231mPa\*s auf 1161mPa\*s. Umgekehrt verringerte sich die Viskosität beim Verhältnis IPA/PG 2:1 auf 96 mPa\*s bei 2030\_21 und 137 mPa\*s bei 3040\_21. Dies unterstreicht die Beobachtung in Abschnitt 4.1.1, dass die Konsistenz bei Austausch von IPA durch PG steigt. Auch hier ist die Verringerung der Quellung von P407 durch IPA als möglicher Grund anzuführen. Außerdem kann die höhere Viskosität von PG im Vergleich zu IPA auch die Viskosität in der Gesamtformulierung erhöhen.

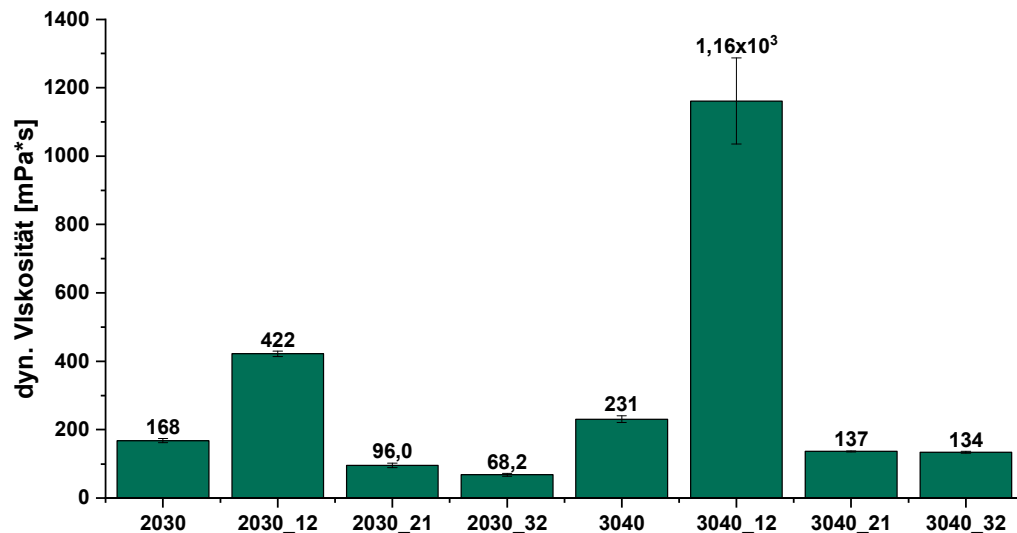


Abbildung 4.34: Dynamische Viskosität bei 20°C – Variation des Mischungsverhältnisses IPA/PG und P407/MKT.

#### 4.5.2 Bestimmung möglicher Thermogelierungspunkte

Mit der Oszillationsrheologie können elastische und viskose Anteile einer Probe bestimmt und somit Aussagen über den Gelierungszustand P407-basierter Formulierungen getroffen werden. Interessant war hier, ob die untersuchten flüssigen Formulierungen eine Thermogelierung zeigten. Läge der Thermogelierungspunkt unterhalb der Oberflächentemperatur der Haut, könnten die Formulierungen nach Applikation halbfest werden und so länger am Applikationsort verweilen.

Erste Versuche wurden mit der hochviskosen Formulierung 4040 und einer Kegel-Platte-Geometrie durchgeführt. Im gesamten Temperaturbereich von 20°C bis 60°C lag  $G'$  über  $G''$  (Abbildung 4.35). In Verbindung mit der beobachteten Fließgrenze bedeutete dies, dass bei dieser Formulierung bereits bei Raumtemperatur ein Gelnetzwerk vorhanden war. Da die Formulierung beim Kippen des Gefäßes fließfähig war, musste dieses Gelnetzwerk jedoch sehr schwach ausgeprägt sein. Dies passte zu der geringen Fließgrenze, die in Abschnitt 4.5.1 beobachtet wurde. Gegen dieses schwache Gelnetzwerk sprachen die relativ hohen absoluten Werte von  $G'$  und  $G''$ . Es wurde vermutet, dass Verdunstungseffekte den Versuch stören. Diese ließen sich durch die lange Messdauer (Temperaturänderung 1°C/min) und die erhöhten Temperaturen auch durch eine Lösemittelfalle nicht ganz ausschließen. Nach längerer

Messzeit wurde am Rand der Geometrie eine Gelierung beobachtet, während die Formulierung in der Mitte flüssig blieb.

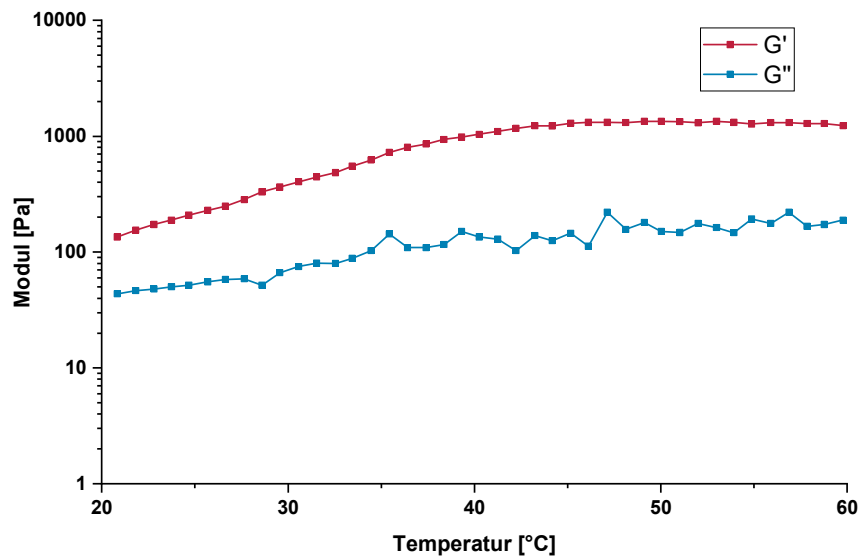


Abbildung 4.35: Temperatursweep der Formulierung 4040. Amplitude 1Pa, Frequenz 0,4Hz.

Aufgrund dieser Ergebnisse kam die Doppelkegel-Messgeometrie zum Einsatz, die die Verdunstung flüchtiger Bestandteile reduzieren sollte. Die Versuche wurden zunächst mit der Formulierung 2040 durchgeführt. Es wurden Amplitudensweeps bei 40°C und 60°C durchgeführt, um eine Temperatur über dem erwarteten TGP zu finden. In beiden Fällen zeigte sich ein gering ausgeprägter LVEB bis etwa 0,1 Pascal (Abbildung 4.36). Bei Abkühlung blieb  $G'$  über  $G''$ , es kam also nicht zu einer Verflüssigung (Abbildung 4.37). Hier passen die Messergebnisse nicht zur beobachteten Konsistenz, da die Formulierung 2040 bei allen Temperaturen dünnflüssig war und keine Fließgrenze zeigte. Bei der „Gelierung“ bei Amplituden unterhalb 0,1 Pascal schien es sich also nicht um Thermogelierung zu handeln. Bei der Thermogel-Rezeptur lagen sowohl der LVEB als auch  $G'$  und  $G''$  in deutlich höheren Bereichen als die hier gemessenen ( $G''$  bei etwa 11000 Pascal, LVEB > 200 Pascal). Denkbar ist, dass die kleine Öffnung an der Achse des Doppelkegels immer noch genug Verdunstungsfläche bot, um diese sehr geringen Werte zu verursachen. Mit der Formulierung 2030, die der Thermogel-Rezeptur im Mischungs-dreieck am nächsten lag, wurden ebenfalls Versuche

durchgeführt. Auch hier zeigte sich ein LVEB  $< 0,1$  Pascal bei  $40^{\circ}\text{C}$  und keine Veränderung durch Abkühlung.

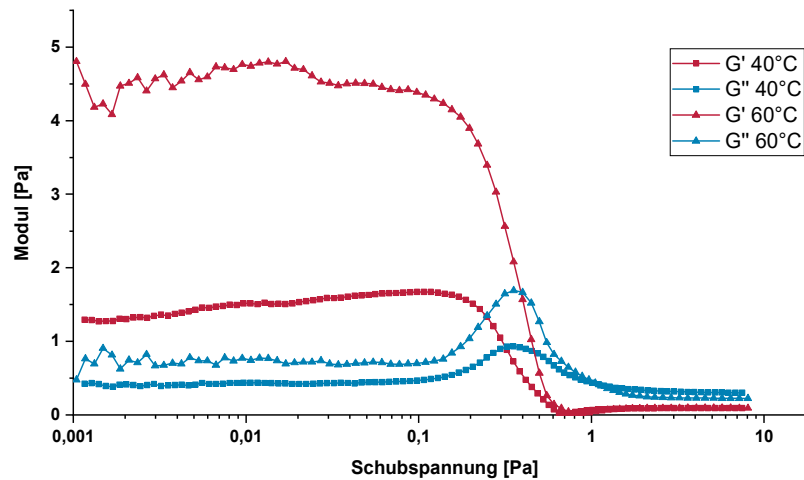


Abbildung 4.36: Amplitudensweep der Formulierung 2040 bei  $40^{\circ}\text{C}$  und  $60^{\circ}\text{C}$  mit Doppelkegel-Messgeometrie, Frequenz 1Hz.

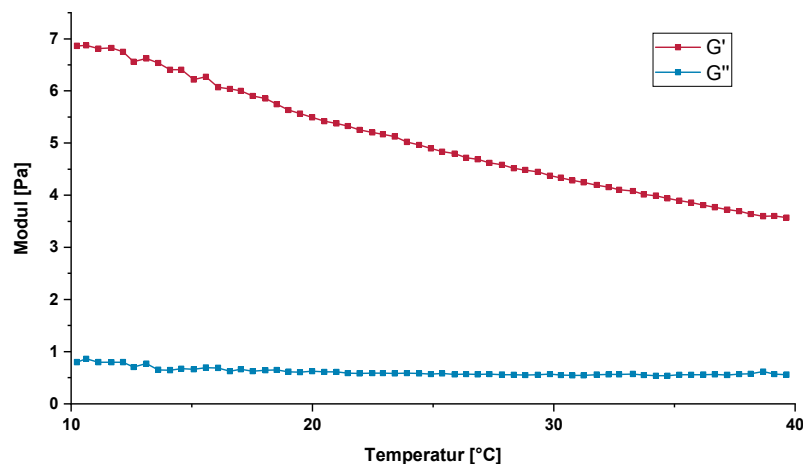


Abbildung 4.37: Temperatursweep der Formulierung 2040 mit Doppelkegel-Messgeometrie. Amplitude  $0,05\text{Pa}$ , Frequenz 1Hz.

Zur Verifizierung wurden alle ausgewählten Formulierungen in einem geschlossenen Vial im Wasserbad auf etwa  $60^{\circ}\text{C}$  erwärmt. Bei keiner der Proben wurde eine Gelierung beobachtet, sodass sich mit großer Wahrscheinlichkeit sagen lässt, dass es sich bei den rheologisch beobachteten Phänomenen nicht um Thermogelierung handelt. Interessant für die praktische Anwendung ist, dass es durch die Verdunstung



von IPA trotzdem zu einer Gelierung auf der Haut kommen kann. Untersuchungen zum Ausmaß der Verdunstung und zu den Eigenschaften der resultierenden Zusammensetzungen könnten sich anschließen.

## 4.6 Dynamische Differenzkalorimetrie

### 4.6.1 Verschiebung endothermer Signale in SC

Der Einfluss der Formulierungen auf die SC-Lipide sollte über die Verschiebung der endothermen Übergänge T2 und T3 beurteilt werden. Um sicherzustellen, dass Reste der Formulierungen an den untersuchten SC-Stücken keine Signale im Messbereich verursachten, wurden zunächst die reinen Formulierungen vermessen. Abbildung 4.38 zeigt Thermogramme von unbehandeltem SC, von SC nach Behandlung mit der Formulierung 0,5S1040 und von der Formulierung 0,5S1040 allein. Der Bereich der horizontalen Achse wurde so gewählt, dass der Bereich sichtbar ist, in dem die Übergänge T2 und T3 typischerweise auftreten. Bei unbehandeltem SC waren beide Übergänge sichtbar, nach Behandlung mit 0,5S1040 waren sie wie erwartet zu niedrigeren Temperaturen verschoben. Die Formulierung 0,5S1040 selbst verursachte keine Signale im ausgewählten Bereich, sodass keine Störungen durch Formulierungsreste zu erwarten waren.

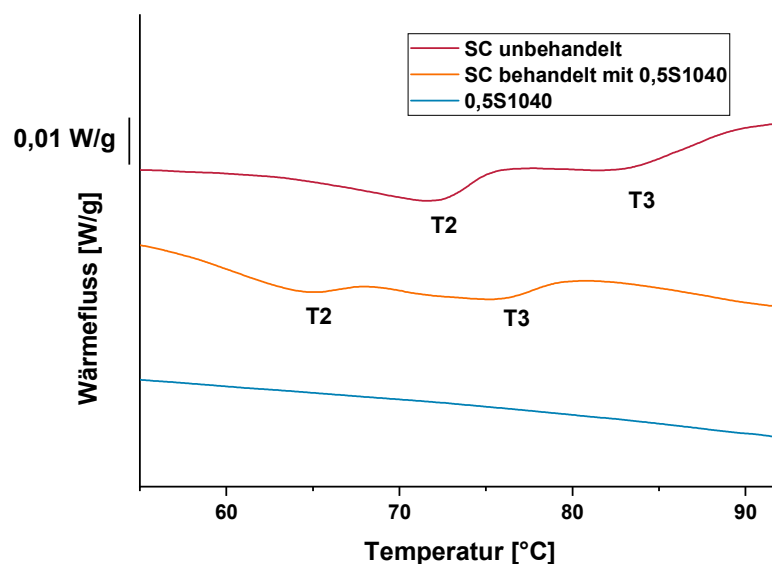


Abbildung 4.38: DSC-Kurven von unbehandeltem SC, SC nach Behandlung mit 0,5S1040 und der reinen Formulierungen 0,5S1040. Ausschnitt des Temperaturbereichs, in dem T2 und T3 auftreten.

Für unbehandeltes SC lag T2 bei 70,50°C und T3 bei 83,39°C (Abbildung 4.39). Durch Behandlung mit Wasser sank T2 um durchschnittlich 2,04°C und T3 um 1,95°C, was mit den Literaturdaten übereinstimmt (Täuber und Müller-Goymann, 2015a). Nach Behandlung mit P07-basierten Formulierungen lagen T2 und T3 in allen Fällen signifikant niedriger. Die Abweichung von T2 betrug zwischen 6,20°C und 4,02°C, die Abweichung von T3 zwischen 9,77°C und 6,01°C. Die Formulierung 0,3S1030 hatte dabei den stärksten Einfluss auf T2 und T3, die Formulierung 0,45S2030 den geringsten. IPA, PG und MKT sind als Permeationsenhancer bekannt, die auf unterschiedliche Art und Weise die SC-Lipide beeinflussen. Auch Wasser hat eine Auswirkung auf deren Fluidität (Barry, 1987).

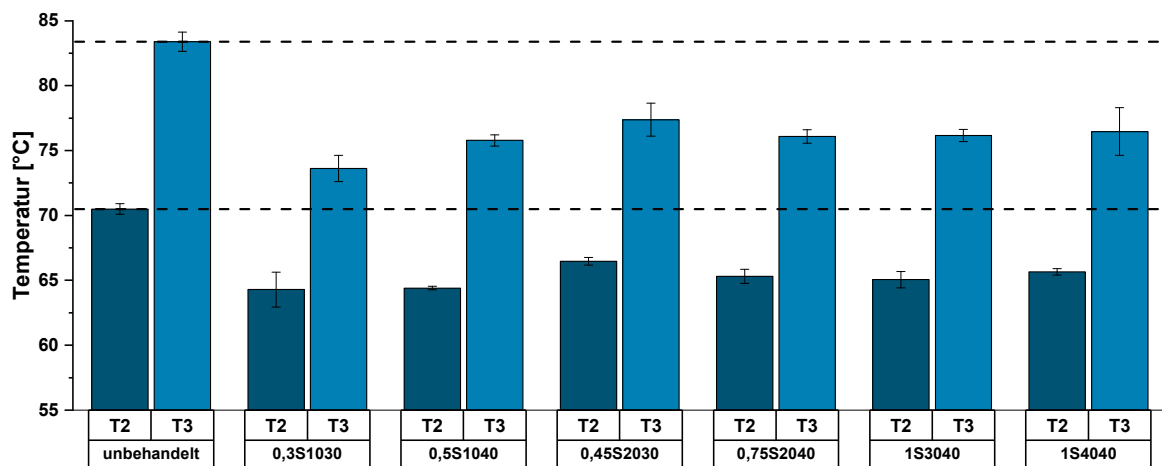


Abbildung 4.39: Temperatur der endothermen Übergänge T2 und T3 von SC nach Behandlung mit P407-Formulierungen, n=3. Gestrichelt: Temperatur der Übergänge T2 und T3 von unbehandeltem SC (Referenz).

Das Ausmaß der Verschiebung von T2 und T3 hängt vom Zusammenspiel aller Komponenten ab. So fanden frühere Untersuchungen, dass IPA allein keinen Effekt hatte, während Formulierungen mit hohem IPA/PG-Gehalt die stärksten Verschiebungen zeigten (Täuber und Müller-Goymann, 2015a). MKT hatte von den Einzelkomponenten den stärksten Effekt, das Entfernen von MKT aus Formulierungen hatte jedoch keinen großen Einfluss auf T2 und T3. Auch bei dieser Untersuchung zeigte sich, dass die Hydratisierung des SC eine entscheidende Rolle spielt: Obwohl die Formulierung 1S4040 größere Anteile an allen drei Permeationsenhancern hatte als 0,3S1030, fiel die Verschiebung von T2 und T3 geringer aus. In diesem

Zusammenhang könnte der P407-Anteil eine Rolle spielen. Denkbar ist, dass durch die Wechselwirkung einer höheren Anzahl an Mizellen untereinander die Diffusion von IPA, PG und MKT in das SC erschwert wird. Verbunden mit einer verringerten Quellung durch den niedrigen Wassergehalt kann dies eine Erklärung für die geringere Verschiebung von T2 und T3 liefern.

#### **4.6.2 Denaturierungstemperatur von Keratin in BH, KF und NS**

Die ersten Versuche dieses Abschnitts wurden mit KF durchgeführt. Bei Erhitzen der KF entstanden durch die Denaturierung des Keratins endotherme Events im Thermogramm. Die Fragestellung war, ob diese Events durch Einwirken der Formulierungen zu niedrigeren Temperaturen verschoben wurden, wie es bei den ungalen Permeationsverbesserern Harnstoff und N-Acetylcystein beobachtet wurde (Thatai und Sapra, 2017). Nach 24 Stunden in bidestilliertem Wasser waren zwei Signale bei 224,4°C und 235,4°C sichtbar. Wortmann et al. brachten zwei Signale bei der Denaturierung verschiedener Keratine mit einer Denaturierung der alpha-Helices (1. Signal) und der Zersetzung der Matrix (2. S), vor allem Cystin, in Verbindung (Wortmann und Deutz, 1993). Nach Behandlung mit einer wässrigen 5%-igen Harnstofflösung war ein Signal bei 214,7°C vorhanden, ein sehr schwaches zweites Signal bei etwa 200°C war nur ansatzweise zu erkennen (Abbildung 4.40). Im Vergleich zu der 24-stündigen Behandlung mit Wasser sank die Temperatur des 2. Signals um 20,7°C. Dieser Wert lag etwas niedriger als in der Untersuchung von Thatai und Sapra, eine Verschiebung war jedoch auch hier eindeutig zu erkennen.

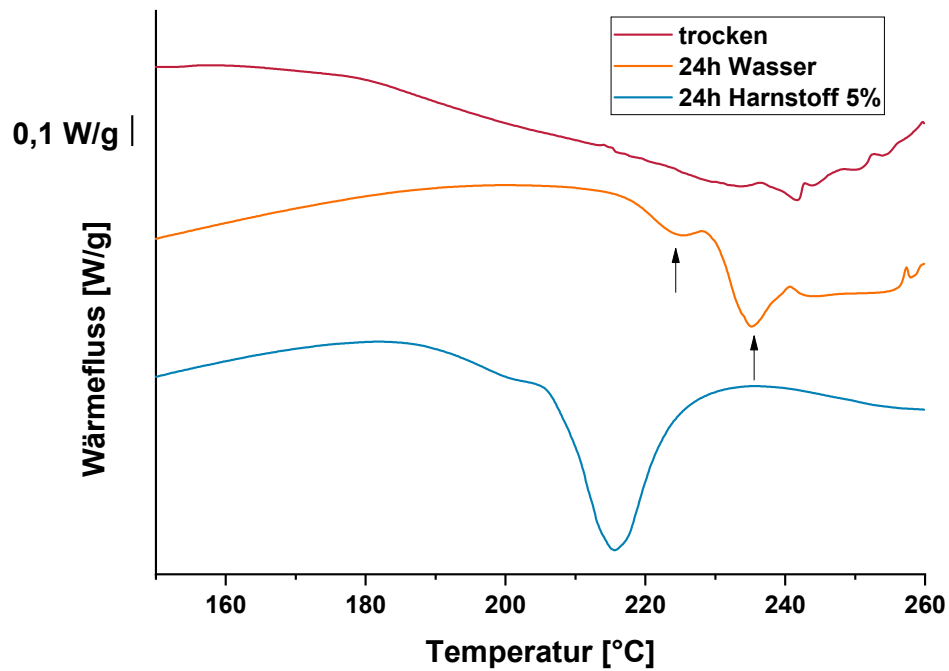


Abbildung 4.40: Repräsentative DSC-Einzelmessungen von KF in trockenem Zustand sowie nach 24 Stunden Behandlung mit Wasser und wässriger 5%-iger Harnstofflösung, n=3.

Bei BH war nach 24 Stunden in bidestilliertem Wasser nur ein Signal bei 226,0°C zu sehen (Abbildung 4.41). Nach Behandlung mit 5%-iger Harnstofflösung wurde das Signal deutlich breiter und sein Maximum wurde zu niedrigeren Temperaturen verschoben. Das Maximum lag bei 215,6°C, war jedoch durch die Breite des Signals schwierig festzulegen. Die Verschiebung war hier also mit 10,4°C geringer bei den KF.

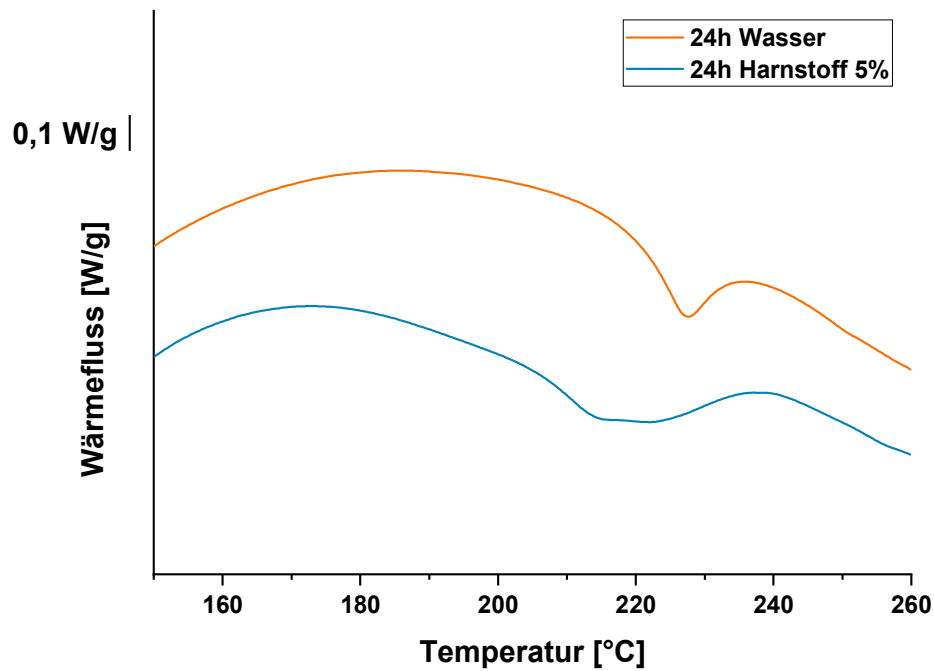


Abbildung 4.41: Repräsentative DSC-Einzelmessungen von BH nach 24 Stunden Behandlung mit Wasser und wässriger 5%-iger Harnstofflösung,  $n=3$ .

Da ein Effekt auf die Denaturierungstemperatur des Keratins zu sehen war, wurden im nächsten Schritt Versuche mit P407-basierten Formulierungen durchgeführt. Dies geschah für KF mit den wirkstofffreien Systemen 2040, 3040 und 4040 sowie mit den wirkstoffhaltigen 0,5S1040, 0,75S2040 und 1S4040. Als Vorversuch wurde die Formulierung 0,75S2040 mit dem gleichen Temperaturprogramm vermessen, um durch die Formulierung verursachte Signale auszuschließen. Es wurde ein endothermes Signal bei 164°C beobachtet, das vermutlich durch Schmelzen von SRT (Literaturwert 158-160°C) verursacht wurde.

Nach Behandlung mit P407-basierten Formulierungen kam es zu unterschiedlichen Kurvenverläufen: Allgemein wurden die Signale breiter und unregelmäßiger, besonders ausgeprägt war dies bei den Formulierungen 1S4040 und 0,5S1040 (Abbildung 4.42). Die Verbreiterung der Signale weist vermutlich auf eine gleichzeitig stattfindende Pyrolyse des Keratins hin (Wortmann und Deutz, 1993), die das Signal der Denaturierung teilweise überlagerte. Breite, unscharfe Signale traten auch beim Erhitzen unbehandelter, nicht vorgequollener KF auf (Abbildung 4.40). Erst nach Quellung in Wasser waren die schärferen Signale der Denaturierung erkennbar. Da

die Formulierungen relevante Anteile nichtwässriger Bestandteile hatten, war die Quellung hier weniger ausgeprägt als in Wasser und die Pyrolyse des Keratins ist im Thermogramm sichtbar. Da die Verbreiterung des Signals bei der Formulierung 0,5S1040 mit dem höchsten Wasseranteil stark ausgeprägt war, existieren wahrscheinlich noch weitere Einflussfaktoren auf Form und Größe der Signale.

Nach Behandlung mit 2040, 3040 und 4040 wurde keine signifikante Verschiebung der Signale gegenüber der Behandlung mit Wasser beobachtet (Kurven nicht abgebildet). Die Temperaturen der Signale lagen bei 0,5S1040 und 0,75S2040 ebenfalls auf ähnlichem Niveau wie bei der Referenz in bidestilliertem Wasser (Abbildung 4.42). Bei 1S4040 lag die Temperatur mit 222,7°C etwas niedriger, zusätzlich war das Signal nicht mehr symmetrisch. Ein Vergleich der Temperaturen wurde dadurch erschwert.

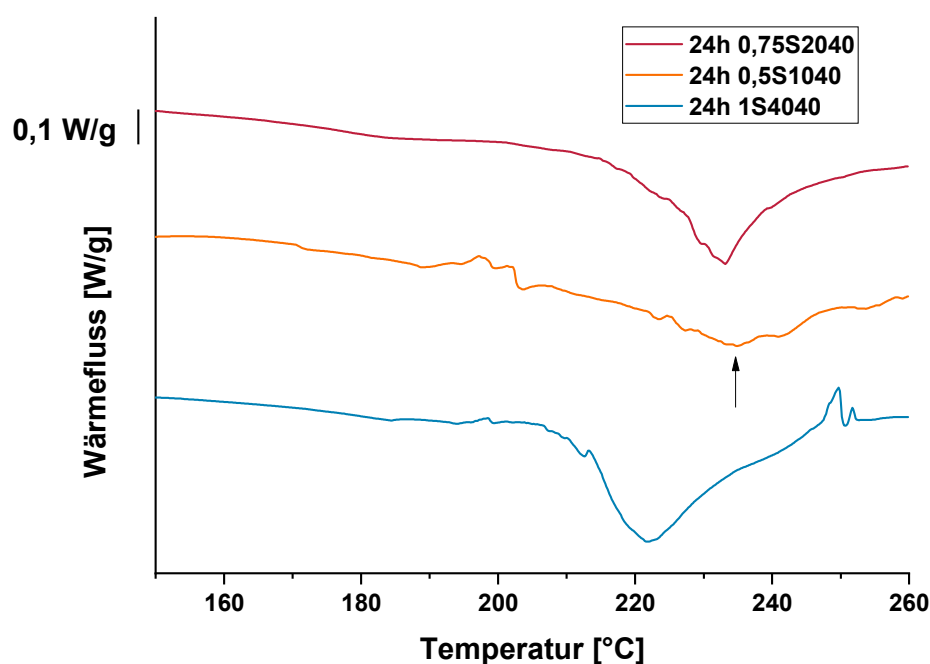


Abbildung 4.42: Repräsentative DSC-Einzelmessungen von KF nach 24 Stunden Behandlung mit P407-basierten Formulierungen, n=3.

Die Behandlung von BH wurde mit der wirkstofffreien Formulierung 3040 und den wirkstoffhaltigen Formulierungen 1S4040 und 0,5S1040 durchgeführt. In allen drei Fällen kam es zu einer deutlichen Verbreiterung und Abflachung des Signals im Vergleich zur Vorquellung in Wasser (Abbildung 4.43 und Abbildung 4.41). Die

Temperaturen der Signale lagen zwischen 204°C und 209°C, waren jedoch aufgrund des flachen Verlaufs nur schwer auf einen Wert festzulegen. Daher ist ein Vergleich mit der Temperatur nach Behandlung mit Wasser kaum möglich.

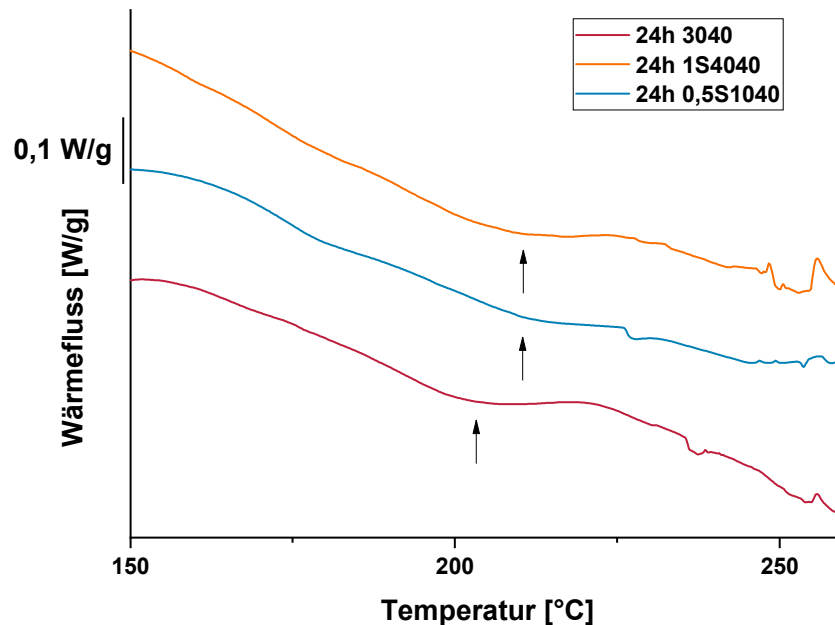


Abbildung 4.43: Repräsentative DSC-Einzelmessungen von BH nach 24 Stunden Behandlung mit P407-basierten Formulierungen.

Als Zusatzversuch wurden NS mit bidestilliertem Wasser, 5%-iger Harnstofflösung oder der Formulierung 0,75S2040 behandelt. Die Denaturierungstemperatur nach Behandlung mit Wasser wurde bei 228,3°C beobachtet, durch die Harnstofflösung sank sie auf 212,2°C (Abbildung 4.44). Nach Behandlung mit 0,75S2040 waren zwei Signale vorhanden, die im Mittel bei 191,9°C und 218,8°C lagen. Vermutlich handelt es sich um die beiden Signale, die Wortmann und Deutz (1993) bei verschiedenen Keratinen beobachteten und der Denaturierung der alpha-Helices und der Matrix zuordneten. Nach Behandlung mit Wasser und Harnstoff waren die Signale schwächer ausgeprägt, sodass das erste, kleinere Signal nicht mehr sichtbar gewesen sein könnte. Eine Verschiebung der Temperatur im Vergleich zur Behandlung mit Wasser wurde deutlich, auch wenn sie nicht so ausgeprägt war wie nach der Behandlung mit der wässrigen Harnstofflösung. Zusammen mit den größeren Integralen der Signale bei 0,75S2040 lässt sich eine Beeinflussung der NS durch die Formulierung vermuten.

Welche Komponenten für diese Beeinflussung verantwortlich sind, müsste in weiteren Versuchen geprüft werden.

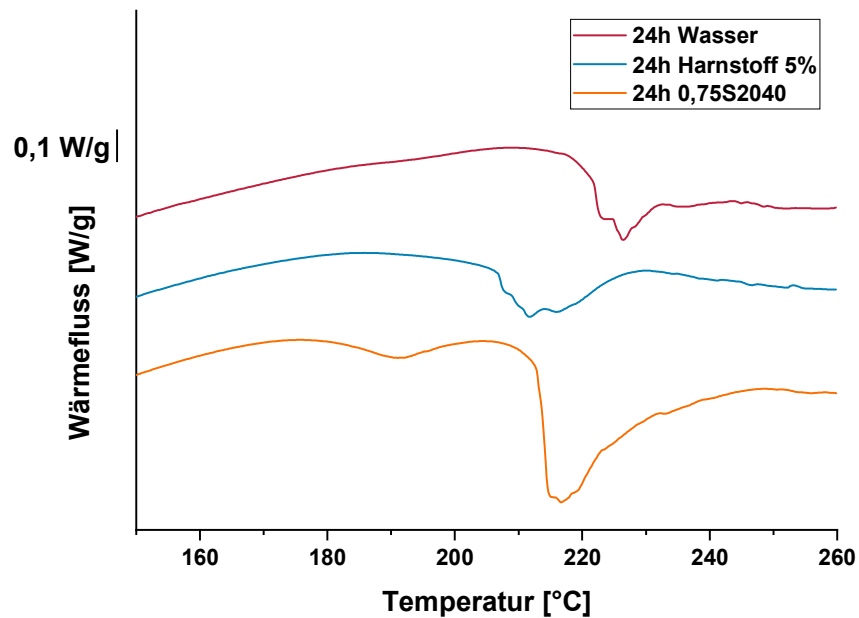


Abbildung 4.44: Repräsentative DSC-Einzelmessungen von NS nach 24 Stunden Behandlung mit Wasser, wässriger 5%-iger Harnstofflösung und 0,75S2040, n=3.



## 5 Abschlussdiskussion

### 5.1 Physikochemische Eigenschaften und Stabilität Poloxamer 407-basierter Formulierungen

Formulierungen aus einem pseudoternären Mischungsdiagramm mit den Komponenten P407/MKT, IPA/PG und Wasser wurden hergestellt, charakterisiert und auf ihre Stabilität untersucht. Die Zusammensetzung basierte auf Vorarbeiten von Täuber (2016). Zuvor waren P407-basierte Formulierungen bereits mit unterschiedlichen Wirkstoffen auf ihre permeationsfördernden Effekte durch SC und Nagelmodelle untersucht worden, zu den Wirkstoffen zählten 5-ALA (Grüning, 2007; van Hemelrijck, 2012), Lidocain (van Hemelrijck, 2012), TBF (Lusiana, 2012; Täuber, 2016), CPX (Täuber, 2016) und Ibuprofen (Schmid, 2016). In früheren Arbeiten wurde DMIS statt PG eingesetzt, Täuber ersetzte DMIS durch PG aufgrund einer Inkompatibilität mit TBF. Da PG im Unterschied zu DMIS im Europäischen Arzneibuch monographiert ist, wurde diese Änderung beibehalten.

Der Fokus früherer Arbeiten lag auf halbfesten Formulierungen, dies wurde unter anderem mit der einfachen Anwendung und dem Verbleiben an der Applikationsstelle begründet (van Hemelrijck, 2012). In Arbeiten von Täuber stellte sich heraus, dass flüssige Zusammensetzungen bessere Permeationseigenschaften durch Nagelmodelle erzielten als die halbfesten Varianten. Aus diesem Grund konzentrierten sich die in der vorliegenden Arbeit diskutierten Untersuchungen im Unterschied zu früheren Arbeiten auf den flüssigen Bereich des Mischungsdiagramms.

Die Grenze des halbfesten Bereichs lag bei 20%-30% IPA/PG. Oberhalb von 30% IPA/PG nahm die Konsistenz ab. Allerdings waren bei einem Anteil von 30% IPA/PG Formulierungen mit 40% P407/MKT und mehr noch halbfest, Formulierungen mit 30% P407/MKT und weniger waren flüssig bis zähflüssig. Die Erhöhung des Anteils P407/MKT wirkte sich erwartungsgemäß konsistenz erhöhend aus, da mehr P407 für die Mizellbildung zur Verfügung stand. Die Zugabe von IPA/PG führte allgemein zu einer Verringerung der Konsistenz. Als Grund dafür wurde eine Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen durch IPA mit den hydrophilen Anteilen des P407-Moleküls postuliert, wodurch es zu einer Dehydratation der hydrophilen Anteile kommt und die Mizellbildung gestört wird (van Hemelrijck, 2012).

Eine Variation des Mischungsverhältnis IPA/PG gab weiteren Aufschluss über den konsistenzverringenden Effekt: Bei einem Verhältnis von 2:1 wurden die Formulierungen tendenziell flüssiger, bei einem Verhältnis von 1:2 kehrte sich der Effekt um und einige zuvor zähflüssige Formulierungen wurden halbfest. Dies bestätigte, dass IPA die Komponente war, die die Konsistenzverringung verursachte. Das Mischungsverhältnis P407/MKT wurde ebenfalls variiert, von 4:1 zu 3:2. Dabei nahm die Konsistenz erwartungsgemäß ab, da weniger P407 zur Bildung von Mizellgerüsten zur Verfügung stand.

Bei den flüssigen Formulierungen handelte es sich um Emulsionen mit Tropfengrößen im Mikrometerbereich. Dementsprechend konnte es während der Lagerung zur Aufrahmung und gegebenenfalls zur Koaleszenz kommen. In Stabilitätsuntersuchungen wurde die physikalische Stabilität der Emulsion beobachtet. Dabei wurde festgestellt, dass hohe Anteile IPA/PG nicht nur einen konsistenzverringenden Effekt hatten, sondern auch zu einer Koaleszenz der Formulierungen führten. Dies geschah bei 60% IPA/PG schon kurz nach der Herstellung, bei 50% nach wenigen Wochen bis Monaten. Formulierungen mit 40% IPA/PG und weniger blieben über 24 Wochen bei 30°C stabil aufgerahmt. Bei Variation des Verhältnisses IPA/PG führte das Verhältnis 2:1 zu einer weiteren Destabilisierung, sodass auch Formulierungen mit 40% Anteil brachen, während beim Verhältnis 1:2 auch Formulierungen mit 50% IPA/PG nach 24 Wochen noch stabil waren.

Zusätzlich wurde beobachtet, dass die Stabilität bei einem konstanten Anteil IPA/PG von 40% mit zunehmendem Anteil P407/MKT abnahm. Ein möglicher Grund dafür ist der steigende Anteil der Ölphase, durch den die räumliche Dichte der Emulsionstropfen stieg und ein Zusammenfließen wahrscheinlicher wurde. Bei Variation des Mischungsverhältnisses P407/MKT von 4:1 nach 3:2 waren die Stabilitätsunterschiede zwischen hohem und niedrigem Anteil P407/MKT ausgeprägter, was dafür spricht, dass die absolute Menge MKT eine entscheidende Rolle spielt. In diesem Zusammenhang hatten beim Mischungsverhältnis 3:2 Formulierungen mit niedrigem Anteil P407/MKT eine ähnliche Stabilität wie beim Mischungsverhältnis 4:1, während die Stabilität bei hohen Anteilen P407/MKT für das Mischungsverhältnis 3:2 geringer war als für das Mischungsverhältnis 4:1.

Die Löslichkeit von SRT und dessen Stabilität in den Formulierungen wurde ebenfalls untersucht. Da es sich um einen lipophilen Wirkstoff handelte, war die Sättigungslöslichkeit in den Formulierungen relativ gering im Vergleich zu zuvor untersuchten Antimykotika. Ein Austausch von P407/MKT durch IPA/PG und umgekehrt hatte keinen großen Effekt auf die Sättigungslöslichkeit, ebenso wenig wie die Änderung der Mischungsverhältnisse von IPA/PG bzw. P407/MKT. Entscheidend war somit der Wasseranteil der Formulierungen. Je nach Wasseranteil konnten zwischen 0,3% und 1,5% SRT eingearbeitet werden, wobei dieser im ersten Fall bei 60% und im zweiten Fall bei 20% lag.

Hinweise auf einen Abbau von SRT wurden nicht gefunden. Makroskopisch gab es während der Lagerung keine Unterschiede zu den wirkstofffreien Formulierungen, die Gehaltsbestimmung ergab nach 24 Wochen Werte über 95% des Ausgangsgehaltes.

## **5.2 Permeationsuntersuchungen durch humanes Stratum corneum und Keratinfilm**

In der ersten Permeationsserie mit SC betrugen die relativen Standardabweichungen der permeierten Wirkstoffmengen zwischen 34% und 78%. Da es sich bei SC um ein natürlich gewachsenes Produkt handelt, ist eine hohe Variabilität bekannt und oftmals in der Literatur beschrieben (Stahl et al., 2011; Täuber und Müller-Goymann, 2015b; van Hemelrijck und Müller-Goymann, 2012). Interindividuell sind die Unterschiede dabei so hoch, dass für einen Vergleich unterschiedlicher Formulierungen SC-Stücke von nur einer Spenderin verwendet werden. Die Messergebnisse zeigen jedoch, dass auch die intraindividuellen Unterschiede hohe Standardabweichungen verursachen.

Die Messung des TEER-Wertes in der zweiten Permeationsserie und die darauffolgende Aussortierung der SC-Stücke mit niedrigem TEER-Wert reduzierte die relative Standardabweichung auf 33% bis 67%. Vorher beobachtete „Ausreißer“ mit sehr hohen permeierten Mengen konnten vermieden werden. Dies zeigt, dass eine rein optische Prüfung der SC-Stücke vor Versuchsbeginn nicht ausreicht, um deren Unversehrtheit sicherzustellen. Mikroskopische Löcher, die beispielsweise durch Haarfollikel, aber auch durch die Präparation entstehen können, werden optisch nicht sicher erkannt. Außerdem wurde nachgewiesen, dass der TEER-Wert während der

Permeation abnimmt, wobei dies nicht mit der permeierten Wirkstoffmenge korrelierte. Eine Veränderung des SC durch das Einwirken der Formulierungen wird durch die Änderung des TEER-Wertes jedoch deutlich.

Im Vergleich der P407-basierten Formulierungen konnten zwei Gruppen unterschieden werden. Die erste Gruppe hatte Wassergehalte von 40% und niedriger, bei der zweiten Gruppe lag der Wassergehalt bei 50% und mehr. Die Gruppe mit hohen Wassergehalten führte dabei zu höheren Permeationskoeffizienten. Ein möglicher Grund dafür sind die niedrigen Anteile P407/MKT dieser Formulierungen. Frühere Untersuchungen haben gefunden, dass die Permeation von Wirkstoffen aus Formulierungen mit hohen P407-Anteilen verringert war (Schmid, 2016; Täuber und Müller-Goymann, 2015b). Dies wurde damit begründet, dass durch eine verstärkte Bildung von Mizellgerüsten längere, gewundene Diffusionswege für die Wirkstoffmoleküle entstanden und so die Freisetzung verringert wurde (Gilbert et al., 1986; Täuber und Müller-Goymann, 2015b). Ein weiterer möglicher Effekt ist die Einlagerung des Wirkstoffs in P407-Mizellen (Gilbert et al., 1986), was ebenfalls die Freisetzung aus der Formulierung behindern kann. Dies ist insbesondere bei lipophilen Wirkstoffen wie SRT relevant. Ein Mindestgehalt an P407 ist jedoch notwendig, da es die Solubilisation von SRT ermöglicht und als Tensid auch permeationsfördernde Effekte verursachen kann.

Ein Austausch von Wasser durch IPA/PG verringerte die permeierte Wirkstoffmenge. Alle drei Komponenten sind für ihre permeationsfördernden Effekte auf SC bekannt (Williams und Barry, 2004), in diesem Fall scheint jedoch Wasser die größte Rolle zu spielen. Für den Wirkstoff 5-ALA wurde im Unterschied dazu festgestellt, dass Wasser nur einen geringen Einfluss auf den Permeationskoeffizienten hatte (van Hemelrijck, 2012). Bereits in dieser Untersuchung wurde postuliert, dass die physikochemischen Eigenschaften der Wirkstoffe zu unterschiedlichen Anforderungen an die Zusammensetzung der Formulierungen führen. Da es sich bei 5-ALA um einen hydrophilen Wirkstoff handelt, könnte ein erhöhter Wasseranteil beispielsweise die Löslichkeit in den Formulierungen verbessern und somit die Freisetzung verringern. Bei Einarbeitung von SRT in die Formulierung hingegen kann eine Erhöhung des Wasseranteils dessen Interaktion mit der Formulierung verringern und somit die Freisetzung verbessern, was die permeationsfördernden Effekte des Wassers zusätzlich unterstützt. Ähnliche Überlegungen stellte van Hemelrijck zum Wirkstoff

Lidocain an, da auch bei diesem Wirkstoff Wasser einen größeren Effekt hatte als bei 5-ALA (van Hemelrijck, 2012).

DSC-Untersuchungen sollten Informationen über die Interaktion der Formulierungen mit dem SC liefern und somit Hinweise geben, bei welchen Formulierungen eine gute Permeabilität zu erwarten war. In früheren Arbeiten mit 5-ALA wurde eine direkte Korrelation zwischen Verschiebung der Umwandlungstemperaturen T<sub>2</sub> und T<sub>3</sub> und Permeationskoeffizienten vermutet (Grüning, 2007). Van Hemelrijck (2012) fand jedoch keinen generellen Zusammenhang. In der vorliegenden Arbeit ließen sich die Effekte der Formulierungen auf die Umwandlungstemperaturen der SC-Lipide ebenfalls nachweisen, aber auch hier gab es keine direkte Korrelation mit den Permeationskoeffizienten. Die Formulierung 0,3S1030 zeigte die höchsten Verschiebungen und die Formulierung 0,45S2030 die niedrigsten, beide waren jedoch in der Gruppe mit den besseren Permeationseigenschaften zu finden. Van Hemelrijck erklärte solche Diskrepanzen damit, dass in den DSC-Untersuchungen die Affinität des Wirkstoffs zum Vehikel nicht zum Tragen kommt. Die Ergebnisse mit SRT lassen vermuten, dass dies gerade bei lipophilen Stoffen ein wichtiger Faktor ist, was das Fehlen einer direkten Korrelation erklärt.

In den Permeationsuntersuchungen mit KF lagen die relativen Standardabweichungen mit 10% bis 45% deutlich niedriger als in Versuchen mit SC. Hier zeigt sich ein Vorteil der KF als Nagelmodell: Da sie unter kontrollierten Bedingungen im Labor hergestellt wurden, sind die Ergebnisse besser reproduzierbar als bei natürlichen Produkten. Einzig das Ausgangsmaterial unterliegt natürlichen Schwankungen, weshalb sich auf blonde oder graue, unbehandelte Haare beschränkt wird. Auch im Vergleich zu BH als alternativem Nagelmodell sind geringere Standardabweichungen zu erwarten.

Die höchsten Permeationskoeffizienten wurden an KF für Formulierungen mit 10% P407/MKT beobachtet, mit steigendem Anteil P407/MKT wurde der Permeationskoeffizient geringer. Auch hier spielte also die Freisetzung von SRT aus den Formulierungen eine wichtige Rolle. Ein zweiter Faktor war, dass der Quellungsgrad von menschlichen Nägeln und auch von KF einen Einfluss auf deren Permeabilität hat (Gunt und Kasting, 2007a). Da die Formulierungen mit niedrigen Anteilen P407/MKT gleichzeitig hohe Wassergehalte hatten, konnten sie eine Quellung der KF verursachen und somit die Permeabilität erhöhen. Auch für CPX

wurde ein Anstieg der Permeationskoeffizienten bei Wassergehalten von 60% und mehr beobachtet (Täuber und Müller-Goymann, 2015b), der Effekt ist also nicht Wirkstoff-spezifisch.

Für IPA, PG und MKT war kein permeationsfördernder Effekt in Versuchen mit KF zu erwarten. Die drei Substanzen wirken bei SC über eine Interaktion mit den SC-Lipiden, in KF sind keine solchen Lipide enthalten. Lediglich eine Diffusion von IPA durch die KF und ein dadurch entstehender solvent drag-Effekt wäre denkbar.

Eine Vergleichbarkeit von Permeationsuntersuchungen durch KF mit dem etablierten Nagelmodell BH sowie mit menschlichen Nägeln wurde von Lusiana (2012) diskutiert. Dort wurde ein Dicke-Äquivalent zwischen KF und BH gesucht, bei dem die Permeationskoeffizienten ungefähr gleich waren. KF der Dicke 120µm entsprachen BH der Dicke 100µm. Bei der lipophilen Testsubstanz Rhodamin B war die permeierte Menge durch KF jedoch deutlich höher als durch BH. Beim lipophilen Wirkstoff SRT ist also ebenfalls zu erwarten, dass höhere Mengen durch KF permeieren, die absoluten Werte sind somit mit Vorsicht zu betrachten.

Eine Vergleichsstudie mit menschlichen Nägeln wäre sinnvoll, um die Übertragbarkeit zu untersuchen. Menschliche Nägel sind mit 0,5mm bis 1mm deutlich dicker als die hier verwendeten Nagelmodelle (de Berker et al., 1996; Gunt und Kasting, 2007a). In früheren Arbeiten wurde eine generell niedrigere Permeabilität menschlicher Nägel im Vergleich zu BH gefunden (Mertin und Lippold, 1997a). Die gleiche Studie fand außerdem, dass der menschliche Nagel etwa doppelt so empfindlich für eine Änderung der Molekülgröße ist wie BH. Die Permeabilität größerer Moleküle kann also in Nagelmodellen überschätzt werden.

Die Unterschiede zwischen KF und BH bei der Permeation von SRT werden aktuell in einer Masterarbeit untersucht (Zichacek 2020), die bisherigen Ergebnisse zeigen wie vermutet eine höhere Permeation durch KF als durch BH.

### **5.3 Evaluation der Wachstumshemmung von *T. rubrum* in Infektionsmodellen**

In den Infektionsmodellen mit KF und BH zeigten Formulierungen mit hohen Wassergehalten wie schon bei den Permeationsuntersuchungen tendenziell bessere

Ergebnisse. Einzig die Formulierung 0,5S1040 konnte bei BH eine vollständige Wachstumshemmung von *T. rubrum* in allen Versuchen erzielen. Gründe für das bessere Abschneiden liegen wie bei den Permeationsuntersuchungen vermutlich in der Freisetzung von SRT und in der Quellung der Nagelmodelle.

Die Formulierung 0,3S1030 erzielte schlechtere Ergebnisse als von Permeationsuntersuchungen und Wassergehalt zu erwarten war. Dies kann durch die applizierte Gesamtmenge verursacht sein. Bei den Permeationsuntersuchungen handelt es sich um infinite-dose-Experimente, bei denen der Donor im Überschuss vorliegt und sich die Konzentration von SRT im Verlauf des Versuchs praktisch nicht ändert. In den Infektionsmodellen wurde deutlich weniger Formulierung appliziert und die Versuchsdauer war mit sechs Tagen länger als bei den Permeationsuntersuchungen. Da der Wirkstoffanteil in der Formulierung 0,3S1030 am geringsten war, ist denkbar, dass die applizierte Menge während des Versuches erschöpft wurde. Es ist also möglich, dass Formulierungen mit geringen Wirkstoffgehalt bei einer Mehrfachapplikation besser abschneiden als bei einmaliger Applikation.

Interessant ist es auch, die Unterschiede zwischen den beiden Nagelmodellen zu betrachten. In früheren Untersuchungen wurde die antimykotische Wirksamkeit von Formulierungen getestet, die TBF oder CPX enthielten (Täuber und Müller-Goymann, 2014). Hier kam es in der Regel zu einer vollständigen Wachstumshemmung oder zu vollständigem Wachstum von *T. rubrum*, je nachdem welche Formulierung getestet wurde. Die P407-basierten Formulierungen sowie die Referenz Ciclopoli® hemmten das Wachstum erfolgreich, während die Grundlage Pentravan® mit inkorporiertem Wirkstoff fast keine hemmende Wirkung erzielte. Nur bei Lamisil® kam es zu einer partiellen Wachstumshemmung mit Scores, die im mittleren Bereich lagen. Hier gab es signifikante Unterschiede zwischen KF und BH. Dies lässt vermuten, dass bei anderen Formulierungen Unterschiede zwischen BH und KF nicht erkannt werden konnten, da es sich bei den Scores von 0 (vollständige Wachstumshemmung) und 10 (vollständiges Wachstum) jeweils um die Extremwerte handelte.

Bei den Experimenten mit SRT-haltigen P407-basierten Formulierungen in dieser Arbeit kam es regelmäßig zu einer partiellen Wachstumshemmung, hier wurden in mehreren Fällen Unterschiede in den Scores bei BH und KF beobachtet. Die mittleren

Scores bei Experimenten mit BH waren generell niedriger als bei Experimenten mit KF. Dies kann mit dem Quellungsvermögen der Nagelmodelle zusammenhängen – da BH mehr Wasser aufnehmen können als KF, kann der Effekt von Formulierungen mit hohem Wassergehalt hier ausgeprägter sein. Da das Quellungsvermögen von menschlichen Nägeln zwischen BH und KF liegt, ist die Verwendung beider Modelle zu empfehlen.

Eine weitere Frage ist die Übertragbarkeit auf die Behandlung der Onychomykose in vivo. Zu entscheidenden Unterschieden zählen die einmalige Applikation der Formulierungen im Zeitraum von sechs Tagen sowie die Vermeidung von Verdunstung flüchtiger Bestandteile. Auch die diskutierten Unterschiede zwischen Nagelmodellen und menschlichem Nagel sind relevant. Wie schon bei den Permeationsuntersuchungen wären Versuche mit menschlichen Nägeln interessant, um zu sehen, ob auch hier eine vollständige Wachstumshemmung erreicht werden kann.

Eine mögliche Anpassung des Modells für flüssige Formulierungen ist der Verzicht auf eine Abdeckung des Versuchsaufbaus, sodass flüchtige Bestandteile verdunsten können. Dadurch kommt es zu einer Aufkonzentrierung des Wirkstoffs, was die Freisetzung aus der Formulierung begünstigen kann. Dies kann kombiniert werden mit einer Mehrfachapplikation, um die realen Verhältnisse besser abzubilden.

In den Experimenten mit infiziertem SC kam es bei allen P407-basierten Formulierungen zu einer partiellen Wachstumshemmung von *T. rubrum*. In Versuchen mit CPX in früheren Arbeiten konnten flüssige Formulierungen eine vollständige Wachstumshemmung bewirken, während halbfeste Varianten nur eine geringe hemmende Wirkung zeigten (Täuber und Müller-Goymann, 2015a). Die damals untersuchten Zusammensetzungen wurden für diese Arbeit jedoch nicht berücksichtigt, da sie 50% und mehr IPA/PG enthielten und die Stabilität als nicht ausreichend betrachtet wurde. Daher ist ein direkter Vergleich der beiden Wirkstoffe nicht möglich. Es lässt sich lediglich vermuten, dass CPX bessere Ergebnisse erzielt als SRT.

Eine interessante Beobachtung in beiden Arbeiten war, dass die jeweilige zugelassene Referenz deutlich schlechter abschnitt als die flüssigen P407-basierten Formulierungen. In der Arbeit von Täuber (2015a) war dies Selergo® 1% Creme, in der



vorliegenden Arbeit Mykosert® Spray. Beide Referenzen erzielten keine oder nur eine geringe Wachstumshemmung. Dies lässt hoffen, dass die P407-basierten flüssigen Formulierungen eine Verbesserung gegenüber den Marktprodukten darstellen. Allerdings ist auch zu diskutieren, inwieweit das in vitro-Modell die Ergebnisse zugunsten der P407-basierten Formulierungen beeinflusst haben kann.

Bei Selergo® Creme ist das Ergebnis insofern plausibel, als dass halbfeste Zubereitungen in diesen Experimenten generell schlechter abschneiden als flüssige, sowohl in Infektionsmodellen als auch bei Permeationsuntersuchungen. Die gute Freisetzung und ggf. die Quellung von SC, KF und BH begünstigt Penetration und Permeation der Wirkstoffe. Allerdings ist es möglich, dass die halbfesten Formulierungen diesen Nachteil durch Vorteile in der Anwendung ausgleichen können – sie bleiben länger am Applikationsort, wodurch Penetration und Permeation über einen längeren Zeitraum erfolgen können.

Bei Mykosert® Spray ist zu beachten, dass es während der Versuche zur Austrocknung der Formulierung kam und SRT über dem SC auskristallisierte. Dadurch stand es nicht mehr für die Diffusion in das SC zur Verfügung, was die hohen Scores erklären kann. Auch hier wäre eine Mehrfachapplikation ohne Abdeckung der Formulierungen hilfreich, um den in vivo-Bedingungen näher zu kommen.

## 5.4 Rheologische Eigenschaften

Die Aufnahme von Fließkurven ergab, dass es sich bei den meisten untersuchten Formulierungen bei Raumtemperatur um idealviskose Systeme handelte. Bei hohen Anteilen an P407/MKT wurden geringe Fließgrenzen beobachtet, die auf eine beginnende Gelierung schließen lassen. Die dynamischen Viskositäten stiegen mit steigendem Anteil P407/MKT und mit sinkendem Anteil IPA/PG, wie von den makroskopischen Beobachtungen der Konsistenz erwartet. In Bezug auf die Anwendung hat eine niedrige Viskosität der Formulierungen Vorteile, da niedrigviskose Formulierungen einfach auf die erkrankten Stellen aufgesprüht werden können. So kann im Fall der Onychomykose bzw. Tinea pedis beispielsweise die Nagelfalz besser von der Formulierung erreicht werden. Dies lässt die Formulierungen

mit niedrigen Anteilen P407/MKT als besser geeignet erscheinen, da die beginnenden Fließgrenzen bei Anteilen von 30%-40% die Sprühfähigkeit beeinträchtigen können.

Einarbeitung von SRT führte generell zu einer Abnahme der Viskosität. In früheren Arbeiten wurden bei verschiedenen Wirkstoffen unterschiedliche Effekte auf die Viskosität bzw. auf die Konsistenz beobachtet: CPX und TBF führten ebenfalls zu einer Verringerung der Viskosität, während 5-ALA und Ibuprofen bei vielen Formulierungen zu einer Erhöhung der Viskosität und ggf. zur Ausbildung von Fließgrenzen führten. Auch hier spielen die physikochemischen Eigenschaften der Wirkstoffe und die resultierenden Interaktionen mit P407 eine Rolle. SRT, CPX und TBF wechselwirken als lipophile Stoffe besser mit den lipophilen Polyoxypropylen-Blöcken des Poloxamers. Für TBF wurde diskutiert, dass es sich vermutlich nahe der Polyoxypropylen-Blöcke aufhält und so mit der Assoziation von Poloxamermolekülen zu Mizellen interagiert (Lusiana, 2012). Die Assoziation zu Mizellen setzt nämlich eine Dehydratation der Polyoxypropylen-Blöcke voraus und stellt den ersten Schritt in Richtung Gelierung dar (Cabana et al., 1997). Ein weiteres relevantes Kriterium ist, ob die Wirkstoffe ionisiert vorliegen. Für CPX, das bei niedrigen pH-Werten als Kation vorlag, wurde die Bildung von Mischmizellen mit dem Poloxamer vermutet (Täuber und Müller-Goymann, 2015b). Dabei würde die Dichte der Polyoxyethylen-Blöcke in der Mizellhülle reduziert werden, ebenso die Interaktion der Mizellen untereinander und die Konsistenz nähme ab. SRT liegt bei niedrigem pH-Werten ebenfalls als Kation vor, ein ähnlicher Mechanismus ist also denkbar.

Bei 5-ALA wurde dagegen vermutet, dass durch die Hydrophilie des Wirkstoffs Wasser gebunden wurde und sich die Konsistenz durch die geringere Menge freien Wassers erhöhte (van Hemelrijck, 2012). Ibuprofen wirkte sich in niedrigen Konzentrationen konsistenz erhöhend und in höheren Konzentrationen konsistenzverringend aus, in diesem Fall wurde eine Beteiligung an der Bildung flüssigkristalliner Strukturen diskutiert (Schmid, 2016).

An den untersuchten Formulierungen wurde wie oben beschrieben keine makroskopische Veränderung durch Einarbeitung von SRT beobachtet. Da es sich nur um flüssige Formulierungen handelte, konnte die Veränderung der Viskosität nicht erkannt werden. Zu erwarten ist, dass es bei zuvor halbfesten Formulierungen nahe

der Grenze zum flüssigen Bereich zu einer Verflüssigung durch Einarbeitung des Wirkstoffs kommt.

Bei der Bestimmung von Thermogelierungspunkten zeigte sich, dass keine der untersuchten Formulierungen ein Thermogelieverhalten aufwies. In früheren Untersuchungen, in denen DMIS statt PG und Miglyol® 840 statt MKT verwendet wurden, konnten für die entsprechenden Mischungsverhältnisse mit 20% und 30% P407/Miglyol® 840 Thermogelierungspunkte im Bereich zwischen 30°C und 40°C gefunden werden (van Hemelrijck, 2012). Der Austausch der beiden Komponenten verhinderte also die Thermogelierung bei ansonsten gleichen Mischungsverhältnissen. Dies ist in Anbetracht der ähnlichen Konsistenzen der Formulierungen bei Austausch der beiden Komponenten überraschend. Auffällig war bei van Hemelrijck ein sprunghafter Temperaturanstieg der Thermogelierung ab einem Anteil IPA/DMIS von 30%. Es ist möglich, dass dieser Anstieg bei den hier untersuchten Formulierungen noch steiler ist, sodass bei der vorliegenden Zusammensetzung keine Thermogelierung mehr gefunden werden konnte aufgrund einer Begrenzung der Untersuchungstemperatur zur Vermeidung von Verdunstungsverlusten.

Das Thermogelieverhalten von Poloxamer-Gelen ist für die Formulierungsentwicklung interessant, da Formulierungen durch Gelierung in situ, beispielsweise auf der Haut, am Applikationsort verbleiben können. Dies ist mit den hier entwickelten Formulierungen nicht möglich. Die rheologischen Untersuchungen zeigten jedoch, dass es bei 32° in relativ kurzer Zeit nach dem Auftragen zur Verdunstung flüchtiger Bestandteile, vermutlich vor allem IPA gefolgt von Wasser, kam. Hierdurch kommt es zu einer Aufkonzentrierung von P407 und in der Folge zur Gelierung. Es ist denkbar, dass dieser Effekt die Fließfähigkeit der Formulierungen ausreichend reduziert, um ein Verbleiben an der Applikationsstelle zu erreichen.

Es schließt sich die Frage an, inwiefern sich Penetration und Permeation des Wirkstoffs durch die Verdunstung verändern. Einerseits wird die Diffusion durch die Gelierung erschwert und die permeationsfördernden Effekte von Wasser und IPA werden reduziert. Andererseits kommt es auch zu einer Aufkonzentrierung von SRT, was die Freisetzung aus der Formulierung begünstigt. Interessant wäre hier, das Permeationsverhalten und die Hemmung des Pilzwachstums nach der Verdunstung flüchtiger Bestandteile zu untersuchen.

## 6 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war die Optimierung Poloxamer 407 (P407)-basierter Formulierungen, um einen Wirkstofftransport in Haut und Nagel zu ermöglichen und eine gleichzeitige Behandlung von Fuß- und Nagelpilz zu gestatten. Dabei wurde Sertaconazolnitrat (SRT) als antimykotischer Wirkstoff verwendet. Bei den Formulierungen handelte es sich um flüssige Emulsionen, die nach kurzer Lagerzeit Aufrahmung zeigten. Stabilitätsuntersuchen über 24 Wochen bei 30° ergaben, dass Formulierungen mit >50% Anteil der Mischung Isopropanol (IPA) / Propylenglykol (PG) koaleszierten. Bei einem Anteil von 40% und weniger kam es zu einem Wachstum der Emulsionstropfen, jedoch nicht zum Zusammenfließen. Durch Schütteln ließen sich die Formulierungen wieder homogenisieren, die Tropfengröße wurde dabei reduziert. Die Anteile der Mischung P407 und mittelkettiger Triglyceride (MKT) (Verhältnis 4:1) der stabilen Emulsionen lagen zwischen 10% und 40%, der Wasseranteil zwischen 20% und 60%.

In die Formulierungen ließen sich 0,3% bis 1,5% SRT in gelöster Form einarbeiten. Aufgrund der Lipophilie von SRT war die Löslichkeit dabei hauptsächlich durch den Wassergehalt begrenzt, je mehr Wasser enthalten war, desto geringer die Löslichkeit. Der Wirkstoff blieb in den Formulierungen über 24 Wochen stabil.

Permeationsuntersuchungen durch humanes Stratum corneum (SC) und Keratinfilm (KF) ergaben, dass die höchsten Arzneistofffluxe durch beide Barrieren aus Formulierungen erzielt wurden, die hohe Wasseranteile von mindestens 50% und niedrige Anteile P407/MKT bis zu 20% besaßen. Der hohe Wasseranteil erlaubt eine Quellung von SC und KF, die niedrigen P407-Anteile begünstigen vermutlich die Freisetzung von SRT.

Im Infektionsmodell mit KF und bovinen Hufscheiben (BH) erzielten Formulierungen mit hohem Wassergehalt und niedrigem Anteil P407/MKT ebenfalls die besten Ergebnisse. Die Formulierung 0,5S1040 erreichte in Versuchen mit BH eine vollständige Hemmung des Wachstums von *T. rubrum*, in allen weiteren Versuchen kam es zu einer partiellen Wachstumshemmung. Dabei wurde das Wachstum bei Versuchen mit BH generell stärker gehemmt als bei Versuchen mit KF, was auf die unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften der beiden Nagelmodelle zurückzuführen ist. Die Verwendung beider Modelle erscheint sinnvoll, ein Vergleich mit menschlichen Nägeln könnte sich anschließen.

Die Ergebnisse implizieren, dass Formulierungen mit einem hohen Wasseranteil aufgrund ihrer permeationsfördernden Eigenschaften sowohl durch SC als auch durch Keratinmembranen mögliche Kandidaten für eine gleichzeitige Behandlung von Haut und Nagel sind. Aufgrund der begrenzten Wasserlöslichkeit von SRT war allerdings ein Kompromiss hinsichtlich der Formulierungszusammensetzung notwendig. Das lokale Optimum lag bei 10% P407/MKT, 40% IPA/PG und 50% Wasser (Formulierung 0,5S1040).

Die Konsistenzen der Formulierungen reichten von dünnflüssig bis zähflüssig unmittelbar an der Grenze zur halbfesten Konsistenz, mit dynamischen Viskositäten zwischen 19 mPas und 1370mPas bei 20°C. Eine Thermogelierung wie bei anderen P407-haltigen Systemen wurde nicht beobachtet, es kam jedoch zu Veränderungen der Konsistenz durch Verdunstung von IPA und Wasser. Durch die Konsistenzänderung können die Formulierungen nach dem Aufsprühen ggf. besser am Applikationsort verbleiben, eine Veränderung der Permeationseigenschaften ist dabei möglich.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abeck, D., Haneke, E., Nolting, Siegfried, Reinel, D., Seebacher, C., 2000. Onychomykose: Aktuelle Daten zu Epidemiologie, Erregerspektrum, Risikofaktoren sowie Beeinflussung der Lebensqualität. *Deutsches Ärzteblatt* 97 (28-29), 1964–1986.
- Agut, J., Palacín, C., Sacristán, A., Ortiz, J.A., 1992a. Inhibition of ergosterol synthesis by sertaconazole in *Candida albicans*. *Arzneimittel-Forschung* 42 (5A), 718–720.
- Agut, J., Palacín, C., Salgado, J., Casas, E., Sacristán, A., Ortiz, J.A., 1992b. Direct membrane-damaging effect of sertaconazole on *Candida albicans* as a mechanism of its fungicidal activity. *Arzneimittel-Forschung* 42 (5A), 721–724.
- Albet, C., Fernandez, J.M., Sacristan, A., Ortiz, J.A., 1992. Physico-chemical properties, analytical determinations and stability of sertaconazole nitrate. *Arzneimittel-Forschung* 42 (5A), 695–698.
- Almirall Hermal GmbH, 2017. Fachinformation Ciclopoli® gegen Nagelpilz.
- Alonso, A., Meirelles, N.C., Yushmanov, V.E., Tabak, M., 1996. Water increases the fluidity of intercellular membranes of stratum corneum: correlation with water permeability, elastic, and electrical resistance properties. *Journal of Investigative Dermatology* 106 (5), 1058–1063.
- Aungst, B.J., Rogers, N.J., Shefter, E., 1986. Enhancement of naloxone penetration through human skin in vitro using fatty acids, fatty alcohols, surfactants, sulfoxides and amides. *International journal of pharmaceutics* 1986 (33), 225–234.
- Baden, H.P., Goldsmith, L.A., Fleming, B., 1973. A comparative study of the physicochemical properties of human keratinized tissues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* 322 (2), 269–278.
- Baran, R., Kaoukhov, A., 2005. Topical antifungal drugs for the treatment of onychomycosis: an overview of current strategies for monotherapy and combination therapy. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 19 (1), 21–29.
- Baran, R., Sigurgeirsson, B., de Berker, D., Kaufmann, R., Lecha, M., Faergemann, J., Kerrouche, N., Sidou, F., 2007. A multicentre, randomized, controlled study of the efficacy, safety and cost-effectiveness of a combination therapy with amorolfine nail lacquer and oral terbinafine compared with oral terbinafine alone for the treatment of onychomycosis with matrix involvement. *The British journal of dermatology* 157 (1), 149–157.
- Barry, B.W., 1987. Mode of action of penetration enhancers in human skin. *Journal of controlled release* 6 (1), 85–97.
- Baswan, S.M., Li, S.K., Kasting, G.B., 2016. Diffusion of uncharged solutes through human nail plate. *Pharmaceutical Development and Technology* 21 (2), 255–260.
- Bell-Syer, S.E.M., Khan, S.M., Torgerson, D.J., 2012. Oral treatments for fungal infections of the skin of the foot. *The Cochrane database of systematic reviews* 10, CD003584.
- Björklund, S., Engblom, J., Thuresson, K., Sparr, E., 2010. A water gradient can be used to regulate drug transport across skin. *Journal of controlled release* 143 (2), 191–200.

- Bonnist, E.Y.M., Gorce, J.-P., Mackay, C., Pendlington, R.U., Pudney, P.D.A., 2011. Measuring the penetration of a skin sensitizer and its delivery vehicles simultaneously with confocal Raman spectroscopy. *Skin pharmacology and physiology* 24 (5), 274–283.
- Bouwstra, J.A., Graaff, A. de, Gooris, G.S., Nijse, J., Wiechers, J.W., van Aelst, A.C., 2003. Water distribution and related morphology in human stratum corneum at different hydration levels. *Journal of Investigative Dermatology* 120 (5), 750–758.
- Brandner, J.M., Kief, S., Wladykowski, E., Houdek, P., Moll, I., 2006. Tight junction proteins in the skin. *Skin pharmacology and physiology* 19 (2), 71–77.
- Brinkmann, I., Müller-Goymann, C.C., 2003. Role of isopropyl myristate, isopropyl alcohol and a combination of both in hydrocortisone permeation across the human stratum corneum. *Skin pharmacology and applied skin physiology* 16 (6), 393–404.
- Brinkmann, I., Müller-Goymann, C.C., 2005. An attempt to clarify the influence of glycerol, propylene glycol, isopropyl myristate and a combination of propylene glycol and isopropyl myristate on human stratum corneum. *Die Pharmazie* 60 (3), 215–220.
- Brown, M.B., Khengar, R.H., Turner, R.B., Forbes, B., Traynor, M.J., Evans, C.R.G., Jones, S.A., 2009. Overcoming the nail barrier: A systematic investigation of ungual chemical penetration enhancement. *International journal of pharmaceutics* 370 (1-2), 61–67.
- Burzykowski, T., Molenberghs, G., Abeck, D., Haneke, E., Hay, R., Katsambas, A., Roseeuw, D., van de Kerkhof, P., van Aelst, R., Marynissen, G., 2003. High prevalence of foot diseases in Europe: results of the Achilles Project. *Mycoses* 46 (11-12), 496–505.
- Cabana, A., Ait-Kadi, A., Juhász, J., 1997. Study of the gelation process of polyethylene oxide(a)-polypropylene oxide(b)-polyethylene oxide, copolymer (poloxamer 407) aqueous solutions. *Journal of Colloid and Interface Science* 190 (2), 307–312.
- Carrillo-Muñoz, A.J., Tur-Tur, C., Cárdenes, D.C., Estivill, D., Giusiano, G., 2011. Sertaconazole nitrate shows fungicidal and fungistatic activities against *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, and *Epidermophyton floccosum*, causative agents of tinea pedis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55 (9), 4420–4421.
- Carruthers, A., Melchior, D.L., 1983. Study of the relationship between bilayer water permeability and bilayer physical state. *Biochemistry* 22 (25), 5797–5807.
- Chapman, S.J., Walsh, A., 1990. Desmosomes, corneosomes and desquamation. An ultrastructural study of adult pig epidermis. *Archives of dermatological research* 282 (5), 304–310.
- Croxtall, J.D., Plosker, G.L., 2009. Sertaconazole: A review of its use in the management of superficial mycoses in dermatology and gynaecology. *Drugs* 69 (3), 339–359.
- de Berker, D., 2009. Clinical practice. Fungal nail disease. *The New England journal of medicine* 360 (20), 2108–2116.
- de Berker, D., 2013. Nail anatomy. *Clinics in dermatology* 31 (5), 509–515.
- de Berker, D., Mawhinney, B., Sviland, L., 1996. Quantification of regional matrix nail production. *The British journal of dermatology* 134 (6), 1083–1086.
- di Chiacchio, N., Kadunc, B.V., de Almeida, A.R.T., Madeira, C.L., 2003. Nail abrasion. *Journal of cosmetic dermatology* 2 (3-4), 150–152.

- Dogra, S., Kumar, B., Bhansali, A., Chakrabarty, A., 2002. Epidemiology of onychomycosis in patients with diabetes mellitus in India. *International journal of dermatology* 41 (10), 647–651.
- Downing, D.T., Stewart, M.E., Wertz, P.W., Colton, S.W., Abraham, W., Strauss, J.S., 1987. Skin lipids: an update. *Journal of Investigative Dermatology* 88 (3. Suppl), 2s–6s.
- Dr. Pfleger Arzneimittel GmbH, 2015. Fachinformation Mykosert® Spray.
- Drakensjö, I.T., Chryssanthou, E., 2011. Epidemiology of dermatophyte infections in Stockholm, Sweden: a retrospective study from 2005–2009. *Medical mycology* 49 (5), 484–488.
- Dumortier, G., Grossiord, J.L., Agnely, F., Chaumeil, J.C., 2006. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharmaceutical research* 23 (12), 2709–2728.
- Egelrud, T., 2000. Desquamation in the stratum corneum. *Acta dermato-venereologica. Supplementum* 208, 44–45.
- Elias, P.M., 2007. The skin barrier as an innate immune element. *Seminars in immunopathology* 29 (1), 3–14.
- Elkeeb, R., AliKhan, A., Elkeeb, L., Hui, X., Maibach, H.I., 2010. Transungual drug delivery: current status. *International journal of pharmaceutics* 384 (1–2), 1–8.
- Elkeeb, R., Hui, X., Murthy, N., Maibach, H.I., 2014. Emerging topical onychomycosis therapies - quo vadis? *Expert opinion on emerging drugs* 19 (4), 489–495.
- Epstein, E., 1998. How often does oral treatment of toenail onychomycosis produce a disease-free nail? An analysis of published data. *Archives of dermatology* 134 (12), 1551–1554.
- Escobar-Chávez, J.J., López-Cervantes, M., Naik, A., Kalia, Y.N., Quintanar-Guerrero, D., Ganem-Quintanar, A., 2006. Applications of thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences* 9 (3), 339–358.
- Farré, M., Ugena, B., Badenas, J.M., Márquez, M., Roset, P., Ortiz, J.A., 1992. Pharmacokinetics and tolerance of sertaconazole in man after repeated percutaneous administration. *Arzneimittel-Forschung* 42 (5A), 752–754.
- Gilbert, J.C., Hadgraft, J., Bye, A., Brookes, L.G., 1986. Drug release from Pluronic F-127 gels. *International journal of pharmaceutics* 32 (2–3), 223–228.
- Golden, G.M., McKie, J.E., Potts, R.O., 1987. Role of stratum corneum lipid fluidity in transdermal drug flux. *Journal of pharmaceutical sciences* 76 (1), 25–28.
- Götz, H., 1964. Einblicke in die Epidemiologie der Dermatomykosen im Kohlenbergbau. *Japanese Journal of Medical Mycology* 5 (4), 195–204.
- Grover, C., Bansal, S., Nanda, S., Reddy, B.S.N., Kumar, V., 2007. Combination of surgical avulsion and topical therapy for single nail onychomycosis: a randomized controlled trial. *The British journal of dermatology* 157 (2), 364–368.



- Grüning, N., 2007. Entwicklung und Charakterisierung eines halbfesten Systems zur Verbesserung der Permeation von 5-Aminolävulinsäure durch exzidiertes humanes Stratum corneum. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig.
- Grüning, N., Müller-Goymann, C.C., 2008. Physicochemical characterisation of a novel thermogelling formulation for percutaneous penetration of 5-aminolevulinic acid. *Journal of pharmaceutical sciences* 97 (6), 2311–2323.
- Gunt, H.B., Kasting, G.B., 2007a. Effect of hydration on the permeation of ketoconazole through human nail plate in vitro. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 32 (4-5), 254–260.
- Gunt, H.B., Kasting, G.B., 2007b. Equilibrium water sorption characteristics of the human nail. *Journal of cosmetic science* 58 (1), 1–9.
- Gupchup, G.V., Zatz, J.L., 1999. Structural characteristics and permeability properties of the human nail: A review. *Journal of cosmetic science* 50 (6), 363–385.
- Gupta, A.K., Fleckman, P., Baran, R., 2000. Ciclopirox nail lacquer topical solution 8% in the treatment of toenail onychomycosis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 43 (4. Suppl), 70-80.
- Gupta, A.K., Ryder, J.E., Johnson, A.M., 2004. Cumulative meta-analysis of systemic antifungal agents for the treatment of onychomycosis. *The British journal of dermatology* 150 (3), 537–544.
- Gupta, A.K., Simpson, F.C., 2016. Routes of drug delivery into the nail apparatus: Implications for the efficacy of topical nail solutions in onychomycosis. *The Journal of dermatological treatment* 27 (1), 2–4.
- Gupta, A.K., Studholme, C., 2016. How do we measure efficacy of therapy in onychomycosis: Patient, physician, and regulatory perspectives. *The Journal of dermatological treatment* 27 (6), 498–504.
- Gupta, A.K., Versteeg, S.G., Shear, N.H., 2017. Onychomycosis in the 21<sup>st</sup> Century: An Update on Diagnosis, Epidemiology, and Treatment. *Journal of cutaneous medicine and surgery* 21 (6), 525–539.
- Hadgraft, J., 2004. Skin deep. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics* 58 (2), 291–299.
- Haugh, M., Helou, S., Boissel, J.P., Cribier, B.J., 2002. Terbinafine in fungal infections of the nails: a meta-analysis of randomized clinical trials. *The British journal of dermatology* 147 (1), 118–121.
- Heber, W., Reinel, D., Vogel, W., 1975. über die Tineamorbidity bei See- und Landeinheiten der Bundeswehr. *Mycoses* 18 (10), 435–442.
- Helmdach, M., Thielitz, A., Röpke, E.M., Gollnick, H., 2000. Age and sex variation in lipid composition of human fingernail plates. *Skin pharmacology and applied skin physiology* 13 (2), 111–119.
- Heumann Pharma, 2018. Fachinformation Amorolfing Nagelkur Heumann 5%.
- Holbrook, K.A., Odland, G.F., 1974. Regional differences in the thickness (cell layers) of the human stratum corneum: an ultrastructural analysis. *Journal of Investigative Dermatology* 62 (4), 415–422.

- Hui, X., Chan, T.C.K., Barbadillo, S., Lee, C., Maibach, H.I., Wester, R.C., 2003. Enhanced econazole penetration into human nail by 2-n-nonyl-1,3-dioxolane. *Journal of pharmaceutical sciences* 92 (1), 142–148.
- International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, 2003. ICH Q1A(R2): Stability Testing of new drugs and products.
- Kerai, L.V., Bardés, J., Hilton, S., Murdan, S., 2018. Two strategies to enhance unguinal drug permeation from UV-cured films: Incomplete polymerisation to increase drug release and incorporation of chemical enhancers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 123, 217–227.
- Khengar, R.H., Jones, S.A., Turner, R.B., Forbes, B., Brown, M.B., 2007. Nail swelling as a pre-formulation screen for the selection and optimisation of unguinal penetration enhancers. *Pharmaceutical research* 24 (12), 2207–2212.
- Klaassen, K.M.G., Dulak, M.G., Van De Kerkhof, P.C.M., Pasch, M.C., 2014. The prevalence of onychomycosis in psoriatic patients: A systematic review. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 28 (5), 533–541.
- Kligman, A.M., 1965. Topical pharmacology and toxicology of dimethyl sulfoxide. *Journal of the American Medical Association* 193, 796–804.
- Kobayashi, Y., Komatsu, T., Sumi, M., Numajiri, S., Miyamoto, M., Kobayashi, D., Sugibayashi, K., Morimoto, Y., 2004. In vitro permeation of several drugs through the human nail plate: Relationship between physicochemical properties and nail permeability of drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 21 (4), 471–477.
- Kobayashi, Y., Miyamoto, M., Sugibayashi, K., Morimoto, Y., 1998. Enhancing effect of N-acetyl-L-cysteine or 2-mercaptoethanol on the in vitro permeation of 5-fluorouracil or tolnaftate through the human nail plate. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 46 (11), 1797–1802.
- Kobayashi, Y., Miyamoto, M., Sugibayashi, K., Morimoto, Y., 1999. Drug permeation through the three layers of the human nail plate. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 51 (3), 271–278.
- Lacroix, C., Baspeyras, M., La Salmonière, P. de, Benderdouche, M., Couprie, B., Accoceberry, I., Weill, F.X., Derouin, F., Feuillade de Chauvin, M., 2002. Tinea pedis in European marathon runners. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 16 (2), 139–142.
- Lane, M.E., 2013. Skin penetration enhancers. *International journal of pharmaceutics* 447 (1-2), 12–21.
- Lauharanta, J., 1992. Comparative efficacy and safety of amorolfine nail lacquer 2% versus 5% once weekly. *Clinical and experimental dermatology* 17 (1. Suppl), 41–43.
- Lenaerts, V., Triqueneaux, C., Quartern, M., Rieg-Falson, F., Couvreur, P., 1987. Temperature-dependent rheological behavior of Pluronic F-127 aqueous solutions. *International journal of pharmaceutics* 39 (1-2), 121–127.
- Liebel, F., Lyte, P., Garay, M., Babad, J., Southall, M.D., 2006. Anti-inflammatory and anti-itch activity of sertaconazole nitrate. *Archives of dermatological research* 298 (4), 191–199.

- Liu, P., Kurihara-Bergstrom, T., Good, W.R., 1991. Cotransport of estradiol and ethanol through human skin in vitro: understanding the permeant/enhancer flux relationship. *Pharmaceutical research* 8 (7), 938–944.
- Liu, T., Chu, B., 2000. Formation of homogeneous gel-like phases by mixed triblock copolymer micelles in aqueous solution: FCC to BCC phase transition. *Journal of Applied Crystallography* 33 (3), 727–730.
- Lodén, M., Maibach, H.I. (Eds.), 2012. Treatment of dry skin syndrome: The art and science of moisturizers. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Lusiana, 2012. In vitro evaluation of poloxamer 407-based formulations for topical antifungal administration of terbinafine HCl and assessment of keratin film from human hair as a nail plate model. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig.
- Lusiana, Reichl, S., Müller-Goymann, C.C., 2011. Keratin film made of human hair as a nail plate model for studying drug permeation. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 78 (3), 432–440.
- Lusiana, Reichl, S., Müller-Goymann, C.C., 2013. Infected nail plate model made of human hair keratin for evaluating the efficacy of different topical antifungal formulations against *Trichophyton rubrum* in vitro. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 84 (3), 599–605.
- Malhotra, G.G., Zatz, J.L., 2002. Investigation of nail permeation enhancement by chemical modification using water as a probe. *Journal of pharmaceutical sciences* 91 (2), 312–323.
- Manian, M., Madrasi, K., Chaturvedula, A., Banga, A.K., 2016. Investigation of the Dermal Absorption and Irritation Potential of Sertaconazole Nitrate Anhydrous Gel. *Pharmaceutics* 8 (3).
- Marshall, R.C., 1983. Characterization of the proteins of human hair and nail by electrophoresis. *Journal of Investigative Dermatology* 80 (6), 519–524.
- Mertin, D., Lippold, B.C., 1997a. In-vitro permeability of the human nail and of a keratin membrane from bovine hooves: Prediction of the penetration rate of antimycotics through the nail plate and their efficacy. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 49 (9), 866–872.
- Mertin, D., Lippold, B.C., 1997b. In-vitro permeability of the human nail and of a keratin membrane from bovine hooves: influence of the partition coefficient octanol/water and the water solubility of drugs on their permeability and maximum flux. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 49 (1), 30–34.
- Milobratović, D., Janković, S., Vukičević, J., Marinković, J., Janković, J., Raić, Z., 2013. Quality of life in patients with toenail onychomycosis. *Mycoses* 56 (5), 543–551.
- Moghim, S.M., Hunter, A.C., 2000. Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine. *Trends in Biotechnology* 18 (10), 412–420.
- Mohorcic, M., Torkar, A., Friedrich, J., Kristl, J., Murdan, S., 2007. An investigation into keratinolytic enzymes to enhance ungual drug delivery. *International journal of pharmaceutics* 332 (1-2), 196–201.
- Mojumdar, E.H., Pham, Q.D., Topgaard, D., Sparr, E., 2017. Skin hydration: Interplay between molecular dynamics, structure and water uptake in the stratum corneum. *Scientific Reports* 7 (1), 1-13.

- Moll, I., 2016. Nagelveränderungen, in: Moll, I. (Ed.), *Duale Reihe Dermatologie*, 500–504.
- Moll, R., Divo, M., Langbein, L., 2008. The human keratins: biology and pathology. *Histochemistry and cell biology* 129 (6), 705–733.
- Monti, D., Saccomani, L., Chetoni, P., Burgalassi, S., Tampucci, S., Mailland, F., 2011. Validation of bovine hoof slices as a model for infected human toenails: in vitro ciclopirox transungual permeation. *The British journal of dermatology* 165 (1), 99–105.
- Mügge, C., Haustein, U.F., Nenoff, P., 2006. Causative agents of onychomycosis - A retrospective study. *Journal of the German Society of Dermatology* 4 (3), 218–228.
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H.K., Menzel, S., Ruth, P., 2013. *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie*, 10., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Mutschler, E., Schaible, H.-G., Vaupel, P., Thews, G., 2007. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen: 140 Tabellen*, 6., völlig überarbeitete und erweiterte Auflage, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Nair, A., Chakraborty, B., Murthy, N., 2010. Effect of Polyethylene Glycols on the Trans-Ungual Delivery of Terbinafine. *Current drug delivery* 7 (5), 407–414.
- Nakamura, A., Arimoto, M., Takeuchi, K., Fujii, T., 2002. A rapid extraction procedure of human hair proteins and identification of phosphorylated species. *Biological & pharmaceutical bulletin* 25 (5), 569–572.
- Nemes, Z., Steinert, P.M., 1999. Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Experimental & molecular medicine* 31 (1), 5–19.
- Nogueiras-Nieto, L., Begoña Delgado-Charro, M., Otero-Espinar, F.J., 2013. Thermogelling hydrogels of cyclodextrin/poloxamer polypseudorotaxanes as aqueous-based nail lacquers: Application to the delivery of triamcinolone acetonide and ciclopirox olamine. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 83 (3), 370–377.
- Ogasawara, Y., Hiruma, M., Muto, M., Ogawa, H., 2003. Clinical and mycological study of occult tinea pedis and tinea unguium in dermatological patients from Tokyo. *Mycoses* 46 (3-4), 114–119.
- Ongpipattanakul, B., Burnette, R.R., Potts, R.O., Francoeur, M.L., 1991. Evidence that oleic acid exists in a separate phase within stratum corneum lipids. *Pharmaceutical research* 8 (3), 350–354.
- Palacín, C., Sacristán, A., Ortiz, J.A., 1992. In vitro activity of sertaconazole. *Arzneimittel-Forschung* 42 (5A), 699–705.
- Patel, M.M., Vora, Z.M., 2016. Formulation development and optimization of transungual drug delivery system of terbinafine hydrochloride for the treatment of onychomycosis. *Drug delivery and translational research* 6 (3), 263–275.
- Perea, S., Ramos, M.J., Garau, M., Gonzalez, A., Noriega, A.R., del Palacio, A., 2000. Prevalence and risk factors of tinea unguium and tinea pedis in the general population in Spain. *Journal of clinical microbiology* 38 (9), 3226–3230.
- Peter J. Caspers, Hajo A. Bruining, Gerwin J. Puppels, Gerald W. Lucassen, Elizabeth A. Carter, 2001. *In Vivo Confocal Raman Microspectroscopy of the Skin: Noninvasive*

- Determination of Molecular Concentration Profiles. *Journal of Investigative Dermatology* 116 (3), 434–442.
- Piraccini, B.M., Starace, A., Tosti, A., 2013. The Nails, in: Giannetti, A. (Ed.), *Textbook of Dermatology & Sexually Transmitted Diseases*, vol. 1, Stuttgart: Schattauer, 243–250.
- Proksch, E., Brandner, J.M., Jensen, J.-M., 2008. The skin: an indispensable barrier. *Experimental dermatology* 17 (12), 1063–1072.
- Quintanar-Guerrero, D., Ganem-Qintanar, A., Tapia-Olguin, P., Kalia, Y.N., Buri, P., 1998. The Effect of Keratolytic Agents on the Permeability of Three Imidazole Antimycotic Drugs Through the Human Nail. *Drug development and industrial pharmacy* 24 (7), 685–690.
- Reinel, D., 1992. Topical treatment of onychomycosis with amorolfine 5% nail lacquer: comparative efficacy and tolerability of once and twice weekly use. *Dermatology* 184 (1. Suppl), 21–24.
- Richter, T., Müller, J.H., Schwarz, U.D., Wepf, R., Wiesendanger, R., 2001. Investigation of the swelling of human skin cells in liquid media by tapping mode scanning force microscopy. *Applied Physics A* 72, 125–128.
- Rippon, J.W., 1988. *Medical mycology: The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes*, 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Saunders
- Rogers, M.A., Langbein, L., Praetzel-Wunder, S., Winter, H., Schweizer, J., 2006. Human Hair Keratin-Associated Proteins (KAPs), in: Jeon, K.W. (Ed.), *International Review of Cytology*, vol. 251. Elsevier, 209–263.
- Rogiers, V., 2001. EEMCO guidance for the assessment of transepidermal water loss in cosmetic sciences. *Skin pharmacology and applied skin physiology* 14 (2), 117–128.
- Ross-Murphy, S.B., 1995. Rheological characterisation of gels. *Journal of Texture Studies* 26 (4), 391–400.
- Saki, N., Jowkar, F., Alyaseen, S., 2013. Comparison of sertaconazole 2% cream versus hydrocortisone 1% ointment in the treatment of atopic dermatitis. *The Journal of dermatological treatment* 24 (6), 447–449.
- Salter, S.A., Ciocon, D.H., Gowrishankar, T.R., Kimball, A.B., 2006. Controlled nail trephination for subungual hematoma. *The American journal of emergency medicine* 24 (7), 875–877.
- Santos, N.C., Figueira-Coelho, J., Martins-Silva, J., Saldanha, C., 2003. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochemical pharmacology* 65 (7), 1035–1041.
- Schäfer-Korting, M., Schoellmann, C., Korting, H.C., 2008. Fungicidal activity plus reservoir effect allow short treatment courses with terbinafine in tinea pedis. *Skin pharmacology and physiology* 21 (4), 203–210.
- Schmid, S., 2016. Optimierung Poloxamer 407-basierter Mehrkomponentensysteme mit Ibuprofen als Arzneistoff zur kutanen Anwendung: Optimization of ibuprofen-loaded poloxamer 407-based drug delivery systems for dermal application. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig.

- Schmolka, I.R., 1972. Artificial skin I. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns. *Journal of Biomedical Materials Research* 6 (6), 571–582.
- Schweizer, J., Bowden, P.E., Coulombe, P.A., Langbein, L., Lane, E.B., Magin, T.M., Maltais, L., Omary, M.B., Parry, D.A.D., Rogers, M.A., Wright, M.W., 2006. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *The Journal of cell biology* 174 (2), 169–174.
- Seebacher, C., Brasch, J., 2006. Leitlinie Onychomykose. Leitlinien der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft und der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft.
- Seebacher, C., Korting, H.C., 2008. Leitlinie Tinea der freien Haut. Leitlinien der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft und der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft.
- Sigurgeirsson, B., Baran, R., 2014. The prevalence of onychomycosis in the global population – A literature study. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 28 (11), 1480–1491.
- Sotiriou, E., Koussidou-Eremonti, T., Chaidemenos, G., Apalla, Z., Ioannides, D., 2010. Photodynamic therapy for distal and lateral subungual toenail onychomycosis caused by *Trichophyton rubrum*: Preliminary results of a single-centre open trial. *Acta dermato-venereologica* 90 (2), 216–217.
- Southwell, D., Barry, B.W., Woodford, R., 1984. Variations in permeability of human skin within and between specimens. *International journal of pharmaceutics* 18 (3), 299–309.
- Spencer, T.S., Linamen, C.E., Akers, W.A., Jones, H.E., 1975. Temperature dependence of water content of stratum corneum. *The British journal of dermatology* 93 (2), 159–164.
- Stahl, J., Wohler, M., Kietzmann, M., 2011. The effect of formulation vehicles on the in vitro percutaneous permeation of ibuprofen. *BMC pharmacology* 11, 12.
- Ständer, S., Metz, M., Ramos, M.H., Maurer, M., Schoepke, N., Tsianakas, A., Zeidler, C., Luger, T.A., 2015. Anti-pruritic Effect of Sertaconazole 2% Cream in Atopic Dermatitis Subjects: A Prospective, Randomized, Double-blind, Vehicle-controlled, Multi-centre Clinical Trial of Efficacy, Safety and Local Tolerability. *Acta dermato-venereologica* 96 (6), 792–796.
- Stoughton, R.R., McClure, W.O., 1983. Azone®: A New Non-Toxic Enhancer of Cutaneous Penetration. *Drug development and industrial pharmacy* 9 (4), 725–744.
- Sugiura, K., Sugimoto, N., Hosaka, S., Katafuchi-Nagashima, M., Arakawa, Y., Tatsumi, Y., Jo Siu, W., Pillai, R., 2014. The low keratin affinity of efinaconazole contributes to its nail penetration and fungicidal activity in topical onychomycosis treatment. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 58 (7), 3837–3842.
- Szepietowski, J.C., Reich, A., Garlowska, E., Kulig, M., Baran, E., 2006. Factors influencing coexistence of toenail onychomycosis with tinea pedis and other dermatomycoses: a survey of 2761 patients. *Archives of dermatology* 142 (10), 1279–1284.
- Täuber, A., Müller-Goymann, C.C., 2014. Comparison of the antifungal efficacy of terbinafine hydrochloride and ciclopirox olamine containing formulations against the dermatophyte *Trichophyton rubrum* in an infected nail plate model. *Molecular pharmaceutics* 11 (7), 1991–1996.
- Täuber, A., Müller-Goymann, C.C., 2015a. In vitro model of infected stratum corneum for the efficacy evaluation of poloxamer 407-based formulations of ciclopirox olamine against

- Trichophyton rubrum as well as differential scanning calorimetry and stability studies. *International journal of pharmaceutics* 494 (1), 304–311.
- Täuber, A., Müller-Goymann, C.C., 2015b. In vitro permeation and penetration of ciclopirox olamine from poloxamer 407-based formulations—comparison of isolated human stratum corneum, bovine hoof plates and keratin films. *International journal of pharmaceutics* 489 (1-2), 73–82.
- Täuber, A., Müller-Goymann, C.C., 2016. In vitro evaluation of the antifungal efficacy of poloxamer 407-based formulations in an infected nail plate model. *International journal of pharmaceutics* 505 (1-2), 20–23.
- Täuber, A.J., 2016. Poloxamer 407-based formulations with antimycotic ciclopirox olamine for onychomycosis and skin mycosis therapy. Technische Universität Braunschweig, Braunschweig.
- Thatai, P., Sapra, B., 2017. Transungual Gel of Terbinafine Hydrochloride for the Management of Onychomycosis: Formulation, Optimization, and Evaluation. *AAPS PharmSciTech* 18 (6), 2316–2328.
- The Medical Letter, 2009. Antifungal drugs. Treatment guidelines from the Medical Letter 7 (88), 95–102.
- Thomas, J., Jacobson, G.A., Narkowicz, C.K., Peterson, G.M., Burnet, H., Sharpe, C., 2010. Toenail onychomycosis: an important global disease burden. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics* 35 (5), 497–519.
- Thong, H.-Y., Zhai, H., Maibach, H.I., 2007. Percutaneous penetration enhancers: an overview. *Skin pharmacology and physiology* 20 (6), 272–282.
- Tietz, H.J., Kunzelmann, V., Schönian, G., 1995. Wandel des dermatomykologischen Erregerspektrums. *Mycoses* 38 (1. Suppl), 33–39.
- Tietz, H.-J., Hay, R., Querner, S., Delcker, A., Kurka, P., Merk, H.F., 2013. Efficacy of 4 weeks topical bifonazole treatment for onychomycosis after nail ablation with 40% urea: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter study. *Mycoses* 56 (4), 414–421.
- Tosti, A., Piraccini, B.M., Stinchi, C., Colombo, M.D., 1998. Relapses of onychomycosis after successful treatment with systemic antifungals: a three-year follow-up. *Dermatology* 197 (2), 162–166.
- Trommer, H., Neubert, R.H.H., 2006. Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. A review. *Skin pharmacology and physiology* 19 (2), 106–121.
- van Hemelrijck, C., 2012. Physikochemische Charakterisierung von Poloxamer 407-haltigen Systemen für den potentiellen Einsatz von 5-Aminolävulinsäure in der photodynamischen Therapie. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig.
- van Hemelrijck, C., Müller-Goymann, C.C., 2012. Rheological characterization and permeation behavior of poloxamer 407-based systems containing 5-aminolevulinic acid for potential application in photodynamic therapy. *International journal of pharmaceutics* 437 (1-2), 120–129.
- Walters, K.A., Flynn, G.L., 1983. Permeability characteristics of the human nail plate. *International journal of cosmetic science* 5 (6), 231–246.

- Wanka, G., Hoffmann, H., Ulbricht, W., 1990. The aggregation behavior of poly-(oxyethylene)-poly-(oxypropylene)-poly-(oxyethylene)-block-copolymers in aqueous solution. *Colloid & Polymer Science* 268 (2), 101–117.
- Westerberg, D.P., Voyack, M.J., 2013. Onychomycosis: Current trends in diagnosis and treatment. *American family physician* 88 (11), 762–770.
- Wildnauer, R.H., Bothwell, J.W., Douglass, A.B., 1971. Stratum corneum biomechanical properties. I. Influence of relative humidity on normal and extracted human stratum corneum. *Journal of Investigative Dermatology* 56 (1), 72–78.
- Williams, A.C., Barry, B.W., 2004. Penetration enhancers. *Advanced drug delivery reviews* 56 (5), 603–618.
- Wortmann, F.J., Springob, C., Sendelbach, G., 2002. Investigations of cosmetically treated human hair by differential scanning calorimetry in water. *Journal of cosmetic science* 53 (4), 219–228.
- Wortmann, F.-J., Deutz, H., 1993. Characterizing keratins using high-pressure differential scanning calorimetry (HPDSC). *Journal of Applied Polymer Science* 48 (1), 137–150.
- Ya-Xian, Z., Suetake, T., Tagami, H., 1999. Number of cell layers of the stratum corneum in normal skin - relationship to the anatomical location on the body, age, sex and physical parameters. *Archives of dermatological research* 291 (10), 555–559.
- Yeung, K., Ortner, V.K., Martinussen, T., Paasch, U., Haedersdal, M., 2019. Efficacy of laser treatment for onychomycotic nails: a systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *Lasers in medical science* 34 (8), 1513–1525.
- Zichacek, A., 2020. Masterarbeit in Vorbereitung



